

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Établissement d'une lignée de souris transgéniques exprimant
l'isoforme p35 de la chaîne invariante et développement d'un
anticorps polyclonal spécifique**

par

Catherine Ménard

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Magister Scientiae (M.Sc.)
en Microbiologie et Immunologie

Décembre 2006

© Catherine Ménard, 2006

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Établissement d'une lignée de souris transgéniques exprimant l'isoforme p35 de la chaîne invariante et développement d'un anticorps polyclonal spécifique

Présenté par :
Catherine Ménard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Nathalie Labrecque, président-rapporteur

Dr Jacques Thibodeau, directeur de recherche

Dr Claude Perreault, membre du jury



Résumé

La présentation des peptides antigéniques aux cellules T CD4⁺ se fait à l'aide des molécules de classe II du CMH. La chaîne invariante (Ii) est nécessaire à une bonne association dans le réticulum endoplasmique et une maturation adéquate de ces molécules. De plus, un motif de ciblage présent dans la queue cytoplasmique de Ii permet la migration du complexe vers les endosomes où il y aura échange peptidique. Chez l'humain, les principales isoformes sont Iip33 et Iip35. Cette dernière est connue pour avoir un rôle particulier : Iip35 possède une extension de la queue cytoplasmique de 16 acides aminés contenant un motif (RXR) de rétention au réticulum endoplasmique permettant une meilleure maturation des CMH de classe II. Malgré que son rôle ne soit pas bien caractérisé, la dérégulation de son expression semble avoir un impact dans le développement de certaines pathologies telles que le diabète juvénile et certaines leucémies. Nous avons donc comme objectif de développer des outils permettant la caractérisation fonctionnelle de Iip35. Nous avons tout d'abord produit un anticorps polyclonal contre la queue cytoplasmique de Iip35. L'immunogénicité a été augmentée par le couplage de ce peptide à la protéine KLH (Keyhole Limpets Hemocyanin) et par l'utilisation de l'adjuvant de Freund. Les anticorps polyclonaux produits se sont avérés très efficaces puisque nous avons obtenu un titre de 5000 en immunobuvardage. De plus, nous avons produit deux lignées de souris transgénique Iip33 et Iip35. Les gènes humains Iip33 et Iip35 ont été insérés dans le vecteur murin pDOI-6. L'expression des gènes se fait sous le contrôle d'un promoteur inductible présent uniquement dans les cellules présentatrices d'antigènes. Pour ce faire, nous avons optimisé la séquence de Kozak en amont du gène Iip35 permettant ainsi d'augmenter l'efficacité de fixation du ribosome. Les cDNA utilisés étaient mutés à un des codons de départ permettant l'expression exclusive de soit Iip33 ou Iip35. Le criblage par PCR a confirmé l'intégration de Iip33 et Iip35 chez respectivement trois et cinq des souris injectées. Nous avons ensuite déterminé que jusqu'à 38% des lymphocytes B sanguins exprimait Iip35. Ces outils seront très utiles pour apporter des informations sur le rôle de Iip35 dans les maladies autoimmunes et permettre d'avancer les recherches thérapeutiques.

Mots-clés :

Présentation antigénique

CMH de classe II

HLA-DQ

Chaîne invariante

Chaîne invariante p35

Souris transgéniques

Anticorps polyclonaux

Abstract

MHC class II are the predominant molecules implicated in the CD4⁺ T cell antigenic peptide presentation. The MHC class II functionality needs the presence of a chaperone protein called the invariant chain (Ii). The MHC class II assembly and maturation is facilitated by the presence of Ii. The cytoplasmic tail of Ii contains a targeting motif that is important for the migration of the complex to the endosomes where the peptide exchange takes place. In humans, the most important isoforms of Ii are Iip33, and Iip35. Iip35 possesses a 16 amino acid extension of the cytoplasmic tail characterized by the presence of a retention motif (RXR). The function of Iip35 is not well understood, but the deregulation of Iip35 expression seems to cause some diseases like type 1 diabetes and leukemia. We thought that the development of tools to study its function could therefore be useful. First, we produced a polyclonal antibody against the cytoplasmic tail of Iip35. The immunogenicity was increased by the peptide linking with KLH (Keyhole Limpets Hemocyanin) and using Freund adjuvant. The efficiency of the antibodies was measured by Western Blot where we obtained a titer of 5000. Next, we engineered transgenic mice that express Iip33 and Iip35 isoforms. Iip33 and Iip35 human genes were inserted in the murin vector pDOI-6. The genes expression is under the control of an inducible promoter only present in antigen presenting cells. The optimization of the Kozak sequence in front of Iip35 gene will increase the ribosome fixation efficiency. Iip33 and Iip35 cDNAs were mutated for the unique expression of each gene. The screening of the transgenic mice was done by PCR method and we obtained three Iip33 and five Iip35 transgenic mice. The Iip35 expression rate in B cells was measured and up to 38% was positive. This tool will be really useful for further research and helping to understand autoimmune diseases.

Keywords :

Antigenic presentation

MHC class II

HLA-DR

Invariante chain p35

Transgenic mice

Polyclonal antibodies

Table des matières

Résumé.....	iii
Mots-clés :.....	iv
Abstract.....	v
Keywords :.....	vi
Table des matières	vii
Liste des figures.....	ix
Remerciements	x

Chapitre 1: Revue de littérature 11

1.0 Introduction	12
1.1 Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)	14
1.1.1 : Les molécules du CMH classe I.	15
1.1.2 : Les molécules classique du CMH de classe II.	16
1.1.3 Le transactivateur des molécule de classe II : CIITA.....	16
1.1.4 Molécules non-classique des classes II : HLA-DM et HLA-DO	17
1.1.5 Fonctions des molécules classiques de classe II.....	18
1.1.5 a) Présentation des peptides exogènes par les molécules de classe II (traité en détail dans la section 1.3) :	18
1.1.5 b) Sélection thymique :	18
1.2 : La présentation antigénique.....	19
1.2.1 La présentation antigénique par les molécules de CMH de classe I:	19
1.2.2 La présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II	20
1.3 : La chaîne invariante.....	24
1.3.1 Structure de la chaîne invariante.	24
1.3.2 Fonctions de Ii dans l'assemblage et le transport des CMH II.....	27
1.3.3 Ciblage intracellulaire des complexes $\alpha\beta Ii$	27
1.3.4 Rôle de Ii dans la maturation des lymphocytes B	28
1.4 : La chaîne invariante p35.....	29
1.4.1 : Fonctions et particularités de Iip35	29
1.4.2 : Phénotype relié au déséquilibre du ratio de l'expression de Iip33 et de Iip35	31
1.4.3 Les pathologies associées à Iip35	32
1.5 : Les souris " knock out " Ii-/-	33
1.6 : Les anticorps polyclonaux.....	35
1.7 : Objectifs et hypothèses	38

Chapitre 2: Procédures expérimentales	40
2.1 : <i>Établissement de lignées de souris transgéniques Iip33 et Iip35</i>	41
2.1.1 Stratégie de clonage et PCR	41
2.1.2 Lignées cellulaires et transfections	42
2.1.3 Anticorps	42
2.1.4 Expression des plasmides pDOI-6p33 et p35	43
2.1.5 Préparation de l'ADN plasmidique pour microinjection dans des œufs fertilisés de souris.....	43
2.1.6 Criblage des souris transgéniques.....	43
2.1.6 Expression des transgènes	44
2.2 <i>Production d'anticorps polyclonaux anti-Iip35</i>	45
2.2.1 Synthèse et couplage du peptide :.....	45
2.2.2 Immunisation des lapins	45
2.2.3 Détection de la production d'anticorps par ELISA	45
2.2.4 : Titrage et caractérisation de l'anticorps par gel d'acrylamide SDS-PAGE.	46
2.2.4.a) <i>Lysat cellulaire</i> :.....	46
2.2.4.b) <i>Séparation du lysat cellulaire par gel de polyacrylamide SDS-PAGE</i>	46
2.2.5 Purification d'anticorps	47
Chapitre 3: Résultats	48
3.1 : <i>Production de lignées de souris transgéniques Iip33 et Iip35</i>	49
3.1.1 Construction d'un vecteur murin servant à l'expression exclusive de Iip35 ou Iip33.....	49
3.1.2 Expression des constructions plasmidiques.....	51
3.1.3 Établissement des lignées de souris transgéniques et criblage de l'expression de Ii	53
3.1.4 Niveaux d'expression de la chaîne invariante humaine chez les souris transgéniques	58
3.2. <i>Production d'un anticorps polyclonal anti-p35</i>	61
3.2.1 Production d'anticorps polyclonaux anti-Iip35	62
3.2.2 Caractérisation des anticorps anti-Iip35	65
Chapitre 4: Discussion.....	70
4.1 <i>Établissement de lignées de souris transgéniques</i>	72
4. 2 <i>Production d'anticorps polyclonaux spécifiques à Iip35</i>	78
Bibliographie.....	81

Liste des figures

Figure 1.1: Présentation antigénique par les molécules de CMH II au TCR des cellules T CD4+	14
Figure 1.2: Structure des molécules de CMH de classe I et II.	15
Figure 1.3 : Activation de l'expression des gènes des molécules de classes II par CIITA	17
Figure 1.4: Schématisation de la présentation antigénique par le CMH de classe I.....	20
Figure 1.5 : Modèle de trimérisation de la chaîne invariante	21
Figure 1.6 : Dégradation de la chaîne invariante.....	22
Figure 1.7: Schématisation de la présentation antigénique par le CMH de classe-II	23
Figure 1.8: Figure 1.8 Représentation des quatre isoformes de la chaîne invariante	25
Figure 1.9 : Structure du domaine de trimérisation	26
Figure 1.10: Modèle trimérique du domaine transmembranaire de Ii	26
Figure 1.11: Modèle d'activation de NF- κ B par la protéolyse de la queue cytoplasmique de Ii	29
Figure 1.12: Modèle de régulation de la sortie des protéines par 14-3-3	31
Figure 1.13: Représentation de la structure générale des immunoglobulines	36
Figure 3.1 : Carte des plasmides utilisés.	50
Figure 3.2 : Schématisation des étapes de la stratégie de clonage Iip33 et Iip35 Kozak...51	
Figure 3.3 Niveau d'expression de Iip35 à partir de la construction pBudp35kokak.....52	
Figure 3.4 : Niveau d'expression de Ii à partir de pDOI-6.....52	
Figure 3.5 : Digestion BamHI de l'ADN génomique des souris transgéniques Iip35.....54	
Figure 3.6 : Criblage des souris transgéniques p35 par Southern.....56	
Figure 3.7 : Organigrammes démontrant les souris transgéniques obtenues.....57	
Figure 3.8 : Criblage des souris transgéniques Iip35 par PCR.....58	
Figure 3.9 : Criblage des souris transgéniques Iip33 par PCR.....58	
Figure 3.10 : Niveau d'expression de la chaîne invariante p35 chez les lymphocytes B des souris transgéniques.....60	
Figure 3.11 : Niveau d'expression de la chaîne invariante p33 chez les lymphocytes B des souris transgéniques.....61	
Figure 3.12 : Schématisation de l'immunisation des lapins.....64	
Figure 3.13 : Détection de la production d'anticorps sériques par le lapin 1.....65	
Figure 3.14 : Détection de la production d'anticorps sériques par le lapin 2.....65	
Figure 3.15 : Titrage des anticorps anti-p35 produits par les lapins 1 et 2.....66	
Figure 3.16 : Marquage intracellulaire de cellules 293TDR1p35 avec le sérum d'anticorps polyclonaux du lapin 1.....67	
Figure 3.17 : Détection par immunobuvardage de la liaison des anticorps polyclonaux avec Iip35.....68	
Figure 3.18 : Détermination par immunobuvardage de la spécificité de l'anticorps polyclonal anti-Iip35 après purification sur colonne de sépharose.....69	

Remerciements

Je tiens cordialement à mentionner tous les gens qui ont été pour moi une source d'inspiration ou de motivation. Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche Jacques Thibodeau qui a su être disponible pour répondre à toutes mes interrogations et qui a su rediriger mon chemin lorsque mes efforts s'étaient égarées. Je tiens aussi à souligner son excellent sens de l'humour qui permettait de rendre les choses simples et agréables à accomplir. Je désire remercier Sam qui a su m'encadrer dès mes premiers jours au laboratoire qui m'a manqué dès son départ. Georges avec qui j'ai eu des discussions scientifiques des heures durant. Jessy qui a toujours été disponible pour toutes mes questions expérimentales. Tous les anciens et nouveaux membres du laboratoire Francis, Alex, Angie, Nath, MEG, Djibril, Marie-Hélène, Mammad, Jean-Simon qui on su égailler mes journées.

Je désire spécialement remercier Julie qui a eu la patience de me relire et de m'encourager lors de ma rédaction. Guillaume qui a répondu à tous mes questionnements scientifiques et informatiques. Je tiens aussi à remercier toutes mes amies pour leur compréhension lors de mes absences aux soupers ou sorties par causées mes travaux de recherche ... Je veux remercier mes parents Pierre et Sylvie pour leurs appuies, leurs encouragements et surtout de m'avoir enseigner la détermination de me rendre jusqu'au bout des choses. Mes frères Steve et Emmanuel pour les bons moments de rires et de joies passés avec eux me permettant de me reposer avant de mieux continuer.

Finalement, je désire remercier mon amour Jonathan pour sa présence, sa compréhension et ses encouragements tout au long de mes études graduées. Sans lui je n'y serais peut-être pas parvenue. Et merci Esteban pour tes milles sourires...

Merci à tous ceux qui ont fait partie de mon entourage et qui mon aidé à devenir qui je suis...

Chapitre 1: Revue de littérature

1.0 Introduction

L'évolution animale a permis la génération d'un système de défense interne extrêmement complexe : le système immunitaire. Celui-ci est composé de différents organes et cellules spécifiques à son fonctionnement et nécessaires contre tous les types d'attaques possibles, qu'elles soient bactériennes ou virales. Un système de surveillance anti-tumoral en fait même partie.

L'action du système immunitaire est très complexe. Cette action est divisée en deux principales réponses soit la réponse innée qui est la première à réagir contre l'agresseur et la réponse spécifique, aussi appelée acquise, qui est déclenchée lorsque la réponse innée ne parvient pas à éliminer le pathogène. Ces deux types de réponses travaillent conjointement pour réagir contre les envahisseurs microbiens. Par exemple, lorsqu'un microorganisme pathogène pénètre dans le corps soit via la peau, les muscles ou le sang, des cellules présentes aux sites d'infection activeront une série de réactions dans le but d'éliminer l'envahisseur. Les cellules qui font partie de la réponse innée sont des phagocytes tels les neutrophiles, les monocytes et les macrophages. D'autres ont un rôle dans l'inflammation et sont appelés des granulocytes. Les basophiles, éosinophiles et les cellules NK (Natural Killer) en font partie (1,1). Certaines de ces cellules ont pour appellation cellules présentatrices d'antigène (CPA). Ces cellules phagocytent les antigènes pour ensuite les dégrader en peptides. Ces peptides seront par la suite associés à des protéines membranaires, les molécules du complexe majeur d'histocompatibilités (CMH), qui présenteront les peptides aux lymphocytes T. Les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices d'antigène. La phagocytose est donc le lien qui unit la réponse immunitaire innée à la réponse acquise (1-3).

Les principaux acteurs de la réponse immunitaire acquise sont les lymphocytes B et T. Ces cellules circulent dans le corps à la recherche de leur antigène spécifique. Les cellules B peuvent lier directement l'antigène par leurs récepteurs membranaires : des immunoglobulines de surface tandis que les lymphocytes T nécessitent l'apprêtement de

l'antigène pour sa reconnaissance. Les récepteurs membranaires des lymphocytes T (TCR) ne reconnaissent qu'une séquence peptidique de l'antigène. Cette séquence peptidique est présentée par les molécules du CMH (1,2). L'immunité acquise se divise en deux principales réponses : la réponse humorale et la réponse à médiation cellulaire. La réponse humorale est déclenchée par l'activation des lymphocytes B et mènera vers leur différenciation en plasmocytes. La production d'anticorps par les plasmocytes est au centre de la réponse humorale. Les cellules B sont activées selon deux différentes voies dépendamment du type d'antigène présent. La présence d'antigènes thymodépendants ou thymoindépendants discriminera le type de réponse. La différence se situe dans la nécessité d'action directe des cellules T auxiliaires (cellules T_H). L'activation des lymphocytes B se fait l'aide de deux signaux : la liaison à l'antigène et l'activation par la signalisation de cellules T $CD4^+$ (antigènes thymodépendants). Ces cellules dites auxiliaires sont activées par l'entremise des CPA. Les CPA présentent à leur surface des peptides liés aux molécules de classe II du CMH. Cette association entre le TCR et le CMH de classe II est spécifique et engendre l'activation et l'expansion clonale des lymphocytes T $CD4^+$. Il y a par la suite la libération de cytokines qui serviront dans l'activation des lymphocytes B. La réponse à médiation cellulaire implique plutôt les lymphocytes T $CD8^+$ dits cytotoxiques. Ces cellules constituent la surveillance cellulaire par excellence puisque leur fonction est d'éliminer toutes cellules infectées ou démontrant des signes de dérèglements intra-cellulaires. Les cellules T $CD8^+$ s'associent aux molécules de classe I du CMH. Ces molécules sont exprimées de façon ubiquitaire à la surface des cellules de l'organisme. Une fois les lymphocyte T $CD8^+$ activés, ils se différencient en CTL (Lymphocyte T Cytotoxique) qui ont un rôle cytotoxique. Leur activation dépend de 1) la liaison spécifique du TCR au CMH I, 2) du signal de costimulation par CD28-B7 et 3) de l'interaction avec l'interleukine-2. Le déclenchement de l'apoptose des cellules infectées implique la formation d'un conjugué entre la cellule cible et le CTL. Il y aura, par la suite, dissolution de la membrane de la cellule cible suite au contact de granules (perforines et granzymes) sécrétées par le CTL (4).

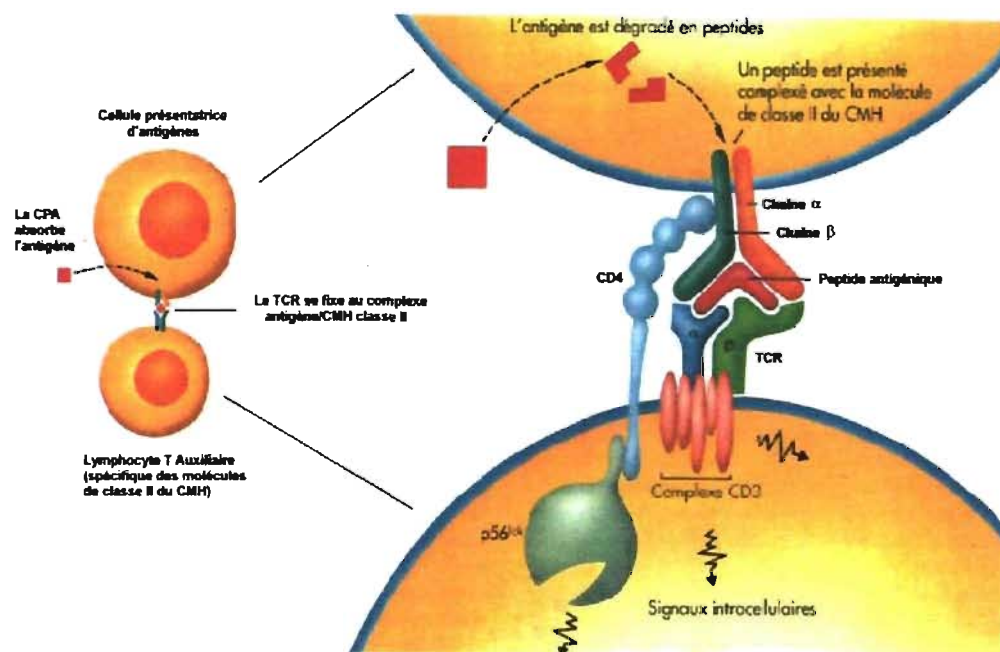


Figure 1.1: Présentation antigénique par les molécules de CMH II au TCR des cellules T CD4+.

Les molécules du CMH II sont exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène. Elles présentent des peptides exogènes qui ont été apprêtés. Une fois à la surface le complexe peptide-CMH sera reconnu par un TCR spécifique (adapté de Boeck-Westmael (127)).

1.1 Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

La découverte du complexe majeur d'histocompatibilité provient d'études sur le rejet de greffes. Les chercheurs avaient observé une diminution des rejets de tissus chez des individus ayant un fond génétique similaire ou identique (jumeaux). D'où l'appellation complexe majeur d'histocompatibilité. Les gènes responsables de ces rejets furent identifiés dans un locus hautement variable qui codait pour des glycoprotéines membranaires. Chez l'humain le CMH prend le nom de HLA (pour *Human Leucocyte Antigen*) alors que chez la souris, il se nomme H-2 (pour *histocompatibility-2*)(5-7).

Le complexe HLA est situé sur le bras court du chromosome 6 et comprend trois sous régions principales de gènes : les classes I, les classes II et les classes III. Les molécules de classes III ne sont pas impliquées directement dans la présentation antigénique mais codent par exemple pour certaines protéines du complément. La région de classe I

comprend les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C alors la région de classe II est composée des gènes HLA-DR, -DP, -DQ, -DM et -DO (8).

1.1.1 : Les molécules classe I du CMH.

Les gènes de classe I codent pour la chaîne α de la glycoprotéine. La chaîne β appelée β_2 -microglobuline est codée sur un chromosome différent de la chaîne α , le chromosome 15. La chaîne α contient trois régions : une région extracellulaire, une région transmembranaire et une région cytoplasmique. Le domaine extracellulaire comporte trois domaines : les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ qui forment la niche peptidique, le domaine $\alpha 3$ associé par un lien non covalent à la β_2 -microglobuline (Figure 1.2). La chaîne lourde glycosylée a un poids moléculaire de 44 kDa alors que la chaîne β_2 de 11.5 kDa (9-11). Les peptides présentés sont de provenance endogène et sont associés à la protéine TAP dans le réticulum endoplasmique. La niche peptidique lie des peptides d'environ 8 à 10 acides aminés. Les molécules de classe I du CMH sont exprimées de façon ubiquitaire dans les cellules somatiques et le niveau d'expression varie en fonction des tissus (12).

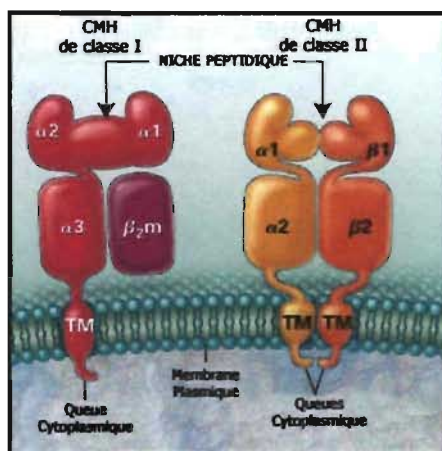


Figure 1.2: Structure des molécules de classe I et II du CMH.

Représentation des molécules HLA de classe I et de classe II. Illustration des domaines luminaux formant la niche peptidique, des domaines transmembranaires et cytoplasmique des molécules de classe I et de classe II du CMH (tiré de 13).

1.1.2 : Les molécules de classe II du CMH classiques.

Les molécules de classe II de structure hétérodimérique sont composées de deux chaînes, une chaîne α et une chaîne β . Chacune d'elle comprend une région extracellulaire, une région transmembranaire et une queue cytoplasmique (Figure 1.2). Les molécules de classe II du CMH dites classiques sont composées des molécules HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP chez l'humain. Chez la souris, le complexe est appelé H-2 et est composé des molécules I-A et I-E. HLA-DR est l'isotype humain le plus documenté et est la première structure tridimensionnelle des molécules de classe II du CMH à avoir été résolue. D'autre part, ces glycoprotéines transmembranaires ont un poids total de 55-60 kDa. La chaîne α , dite lourde, a un poids moléculaire de 31-34 kDa alors que la chaîne β , dite légère, de 26-29 kDa. Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ composent la niche peptidique où le peptide antigénique sera logé et présenté à la surface de la cellule (14). Le peptide provient généralement du milieu extracellulaire et est d'une longueur de 11 à 20 acides aminés (12). Contrairement aux molécules de CMH de classe I, les molécules de classe II ne sont pas exprimées de façon ubiquitaire. Leur expression est plutôt restreinte aux cellules présentatrices d'antigène. Ces cellules sont spécialisées dans l'apprêtement et la présentation des antigènes extracellulaires. Les CPA sont les cellules B, les macrophages et les cellules dendritiques.

1.1.3 Le transactivateur des molécule de classe II : CIITA

Puisque les molécules de classe II sont exprimées seulement dans certains types cellulaires (les CPA), l'organisme contrôle leur expression de façon stricte. CIITA est un activateur direct de l'expression des gènes HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DM, HLA-DO et de la chaîne invariante (Ii). Une série de protéines doivent se lier aux différentes parties du promoteur pour activer la transcription des gènes de classe II. Ce qui discrimine l'expression cellulaire est la présence de CIITA. Il est exprimé chez les CPA et peut être induit par différents facteurs comme l'INF- γ (Figure 1.3). CIITA est reconnu pour sa spécificité car il est de loin le contrôleur majeur de la transcription des gènes pour la présentation antigénique par les molécules de classe II (15).

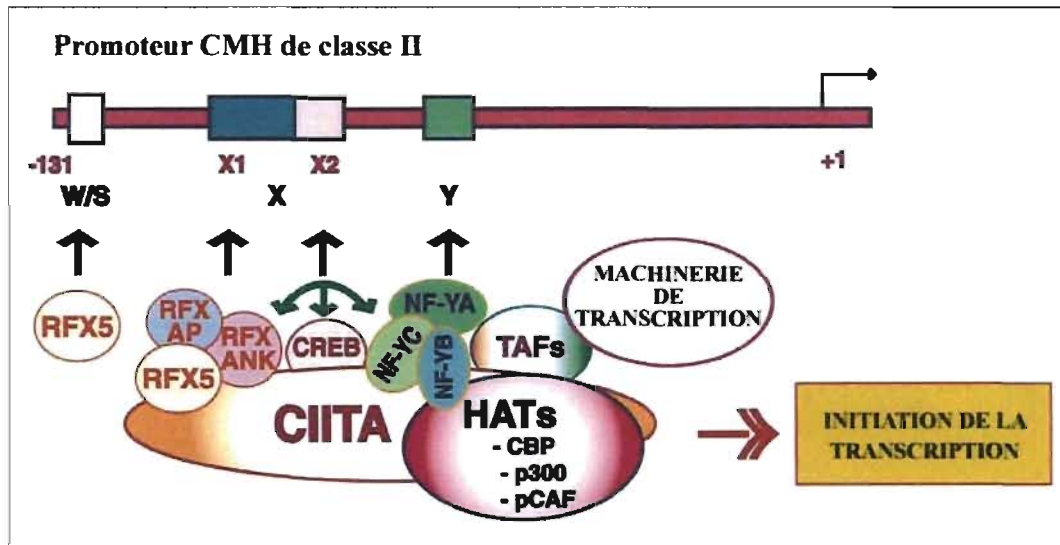


Figure 1.3 : Activation de l'expression des gènes des molécules de classes II par CIITA

Shématisation de l'action du transactivateur CIITA et des facteurs de liaison à l'ADN permettant la régulation de l'expression des molécules de classe II du CMH (tiré de 128).

1.1.4 Molécules non-classique des classes II : HLA-DM et HLA-DO

Les molécules de classe II du CHM sont reconnus comme des protéines très polymorphiques dites classiques. Cependant, l'activation par le transactivateur CIITA provoque l'expression des molécules de classe II non-classiques : HLA-DM et HLA-DO. Leur appellation « non-classique » vient de leur faible polymorphisme. Contrairement aux molécules HLA classiques, leur fonction ne se situe pas dans la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T. Dans le cas de HLA-DM, dont la structure cristalline a été résolue, il a été suggéré que la niche peptidique soit inadéquate pour permettre la liaison de peptides (16). De plus, ces molécules ont un polymorphisme très limité. Leur rôle est toutefois important et se situe au niveau de l'échange peptidique. HLA-DM favorise la liaison de peptides exogènes dans la niche peptidique des molécules de classe II en catalysant l'échange du CLIP (peptide endogène provenant de la liaison de la chaîne invariante). Son rôle est très important du fait qu'en son absence la présentation

antigénique est altérée (16). HLA-DO a une fonction moins connue. Nous savons par contre que cette molécule s'associe avec HLA-DM pour inhiber sa fonction d'échange peptidique. Au niveau cellulaire, ces molécules se situent principalement dans les compartiments tardifs de la voie endocytaire où elles rencontreront les molécules de classe II classiques (16,17).

1.1.5 Fonctions des molécules classiques de classe II

1.1.5 a) Présentation des peptides exogènes par les molécules de classe II (traité en détail dans la section 1.3) :

Le rôle majeur des molécules de classe II du CMH se situe au niveau de la présentation des peptides exogènes. Les molécules de classe II sont des protéines hétérodimériques synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE). Lors de leur synthèse, elles s'associent à la chaîne invariante qui protège la niche peptidique de la liaison de peptides endogènes présents dans le RE. Il sert aussi de chaperon permettant aux molécules de former le complexe nonamérique et assurant sa migration vers les endosomes où des peptides exogènes seront liés. Une fois à la surface, les molécules de classe II du CMH présenteront les peptides antigéniques aux cellules T auxiliaire (T_H). Cette réponse permet aux lymphocytes T CD4⁺ (T_H) d'aller activer les lymphocytes et de permettre leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (voie T_H2). De plus, une fois activés, les lymphocytes T CD4⁺ vont, en plus, interagir avec les macrophages et les lymphocytes T CD8⁺ (18,19).

1.1.5 b) Sélection thymique :

Un autre rôle important des molécules de classe II se situe au niveau de l'éducation des lymphocytes T dans le thymus. Elles ont un rôle primordial dans la discrimination entre le soi et le non-soi. Les cellules T présentes dans le thymus subissent une sélection très stricte où seulement un faible nombre d'entre elles parviendront à la circulation périphérique. Premièrement, il y aura une sélection positive : la survie des thymocytes

dépendra de la capacité des récepteurs TCR à reconnaître les molécules du CMH. Par la suite, les thymocytes qui reconnaissent le CMH et les peptides du soi seront détruits; il s'agit de la sélection négative. Ces deux sélections se font à l'aide du même ligand. La force de liaison permet la discrimination. Une faible affinité des molécules du CMH avec les peptides du soi provoquera la survie des cellules. Cette éducation est très importante puisque si certains lymphocytes T reconnaissant des peptides du soi ne sont pas éliminés, il y aura des lymphocytes T autoréactifs qui pourront causer des pathologies auto-immunes (20).

1.2 : La présentation antigénique

Puisque les TCR ne peuvent reconnaître l'antigène dans sa forme native, celui-ci se doit d'être apprêté et présenté par des molécules du CMH. Dépendamment de sa provenance, il sera présenté par un CMH différent. Les peptides endogènes qui sont présents dans le réticulum endoplasmique de la cellule, par exemple lors d'une infection virale, seront présentés par les molécules de classe I du CMH. Alors que les peptides exogènes provenant de la phagocytose seront présentés par les molécules de classe II du CMH. Une réponse différente sera engendrée selon le type de CMH utilisé. Les CMH de classe I activeront les lymphocytes T cytotoxique (CD8+) qui détruiront les cellules infectées alors que les CMH de classe II activeront les lymphocytes T auxiliaire (CD4+) qui pourront induire deux types de réponses 1) la réponse T_H1 qui contribuera au maintien de l'inflammation et de l'action des cellules T CD8+ 2) la réponse T_H2 qui mènera vers une production d'anticorps par les plasmocytes (21).

1.2.1 La présentation antigénique par les molécules de classe I du CMH

Lors d'une infection par un organisme intracellulaire, il y a présence de peptides antigéniques dans la cellule. Les virus par exemple, utilisent la machinerie cellulaire pour leur synthèse protéique. La présence de protéines étrangères dans le cytoplasme provoque le déclenchement de la réponse cellulaire contre l'envahisseur. Ces protéines seront dégradées en peptides par le protéasome. Ensuite, les peptides seront transportés au

réticulum endoplasmique (RE) par des protéines de transport TAP (Transporters associated with Antigen Processing) (21,22). Une fois dans le RE, les peptides seront par la suite clivés par une aminopeptidase, la protéine ERAAP (ER Aminopeptidase Associated with antigen Processing). Cette protéine semble essentielle à l'apprêtement des peptides présentés par les molécules de classe I (126). Les peptides s'associeront à la niche peptidique des molécules de classe I du CMH. C'est dans le RE que ces molécules sont synthétisées et ce à l'aide de certaines protéines chaperon (calnexine, calréticuline) qui assureront le bon repliement de la molécule. Les domaines α synthétisés séparément de la β 2-microglobuline vont s'associer. Une fois que le complexe a lié le peptide, il va migrer vers la surface permettant ainsi la présentation aux cellules T CD8⁺ (Figure 1.4) (23).

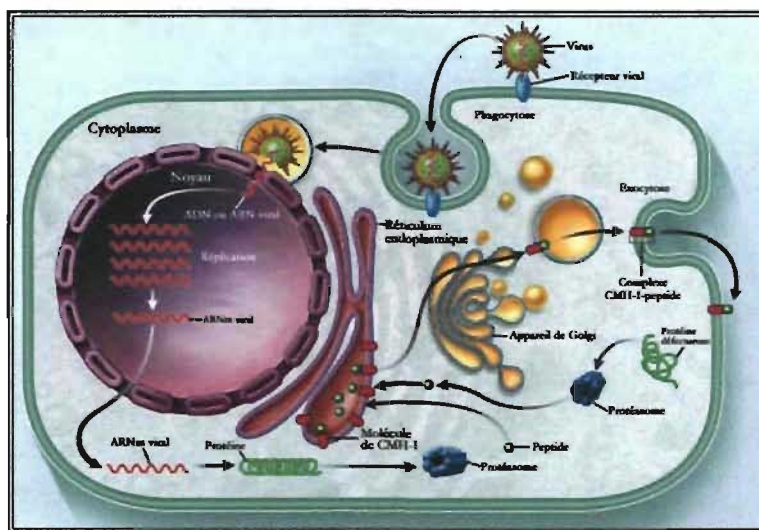


Figure 1.4: Schématisation de la présentation antigénique par le CMH de classe I.

(tiré de 35).

1.2.2 La présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II

Les molécules de CMH II sont synthétisées dans le RE et forment un complexe nonamérique avec la chaîne invariante (Ii). Trois chaînes α seront associées à trois chaînes β et à un trimère de la chaîne invariante. Le domaine de trimérisation est situé

dans la partie luminale de li 18. Celle-ci trimérise avant même de s'associer aux molécules du CMH II (figure 1.5) (24).

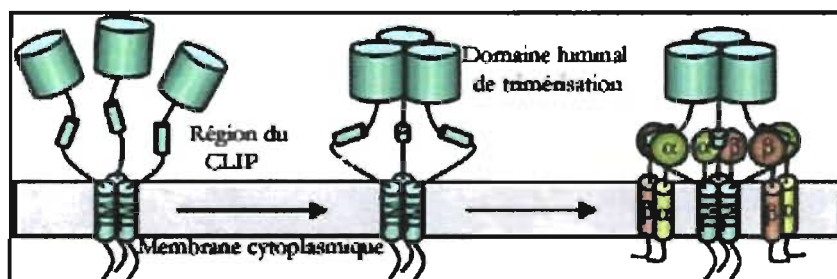


Figure 1.5 : Modèle de trimérisation de la chaîne invariante

Dans ce modèle, l'association des Ii en trimère se fait avant leur liaison avec les molécules $\alpha\beta$. La région transmembranaire semble initier la trimérisation (Tiré de 25).

Ii est une glycoprotéine membranaire de type II et joue un rôle majeur dans la présentation antigénique. Elle assure le bon repliement des molécules du CMH II dans le réticulum et permet une glycosylation adéquate de ces molécules (26). De plus, Ii a un rôle de chaperon et s'assure du transport du complexe CMH II-Ii vers l'appareil de Golgi et les endosomes grâce à la présence de motifs de ciblage présents dans sa queue cytoplasmique (27). L'association de cette chaîne est importante puisque qu'elle se lie à la niche peptidique des CMH II pour prévenir la liaison de peptides endogènes (28). La séquence d'acides aminés de Ii liant la niche peptidique est appelé le CLIP (*Class II associated li chain peptide*) et permet la discrimination entre la voie endogène (CMH I) et la voie endosomale (CMH II) de la présentation antigénique (29).

De plus, les endosomes sont des compartiments cellulaires importants dans l'apprêtement des antigènes exogènes. Ces compartiments sont caractérisés par leur milieu acide et par la présence de protéases. Celles-ci dégradent les protéines exogènes provenant de l'endocytose en peptides qui pourront se lier aux molécules de classe II du CMH (30). Dépendamment du type cellulaire, différentes cathepsines y seront retrouvées. Dans les CPA, on observe principalement la présence de la cathepsine S (31) alors que dans les cellules épithéliales du cortex thymique, la cathepsine L est prédominante (32). Les cathepsines présentes dans les endosomes ont une fonction catalytique et dégradent

graduellement Ii (31). Lorsque le complexe CMH II-Ii migre vers les endosomes, une protéolyse s'effectue avec l'acidification de ces compartiments (Figure 1.6). Seulement une séquence d'au plus 20 acides aminés correspondant aux résidus 81-104 (CLIP) de Ii demeurera liée dans la niche peptidique (30).

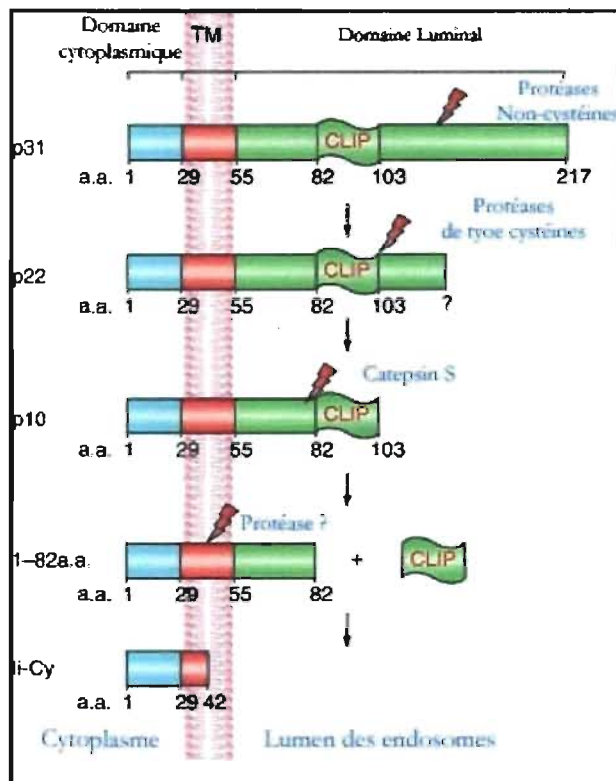


Figure 1.6: Dégradation de la chaîne invariante

La dégradation graduelle de la chaîne invariante se fait par des protéases présentes dans les endosomes (tiré de 33)

Le CLIP sera, par la suite, délogé de la niche peptidique soit par un mécanisme d'autorelargage et/ou avec l'aide de la molécule HLA-DM. Ces molécules absentes de la surface cellulaire s'accumulent dans les compartiments endosomaux et modulent l'échange peptidique (16). La présence de HLA-DM n'est pas indispensable, sa nécessité dépend des allèles des molécules de classe II. Un CLIP avec une forte affinité pour le dimère $\alpha\beta$ aura besoin de l'action de HLA-DM pour être délogé mais une faible affinité du CLIP permettra à celui-ci de se libérer sans l'action de HLA-DM (34). L'action de cette dernière peut être interrompue par la présence de HLA-DO. Celle-ci s'associe avec

HLA-DM et contrevient à l'échange peptidique. Lorsque le peptide a remplacé le CLIP, les molécules de CMH II se rendent à la surface cellulaire pour ensuite initier l'activation des cellules T CD4+ en se liant au TCR spécifique au complexe peptide-molécule de classe II du CMH (Figure 1.7).

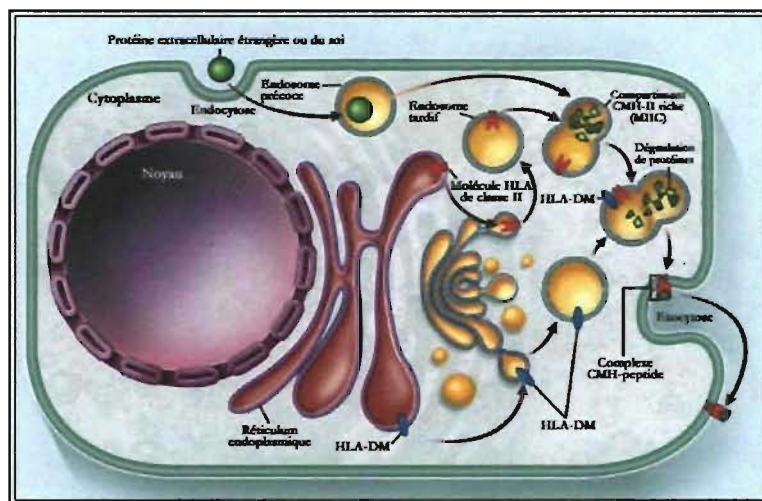


Figure 1.7: Schématisation de la présentation antigénique par le CMH de classe-II

Voie de présentation antigénique impliquant l'entrée des antigènes par endocytose. Les CMH II sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et sont associées à la chaîne invariante. Le complexe $\alpha\beta$ li migre vers le Golgi et par la suite vers les endosomes tardifs. La chaîne invariante est dégradée graduellement avec l'acidification de ces compartiments. Seulement le CLIP reste associé à la niche peptidique. HLA-DM module, à ce niveau, l'échange peptidique avec un peptide exogène présent dans les endosomes. Le complexe HLA de classe II chargé d'un peptide sera transporté vers la surface cellulaire. (Tiré de 35).

Cependant, des études récentes ont démontré que la présentation des peptides exogènes n'était pas exclusive aux molécules de classe II. Certains peptides exogènes provenant d'endocytose ou de phagocytose s'associeraient aux molécules de classe I. Ce phénomène nommé la présentation croisée a permis d'expliquer pourquoi la présence de certains pathogènes exogènes activaient la voie cellulaire cytotoxique (CD8+). La fusion des phagosomes avec certains compartiments cellulaires provoquerait un compartiment où les échanges peptidiques se feraient autant avec les molécules de classe I que les molécules de classe II (3).

1.3 : La chaîne invariante

1.3.1 Structure de la chaîne invariante.

Il est une protéine non-polymorphique de type II. La particularité des protéines de type II est que le domaine terminal NH₂ est cytoplasmique alors que le domaine terminal COOH est luminal. La forme la plus importante est composée de 216 acides aminés. Cette protéine possède trois régions, une région cytoplasmique, une région transmembranaire et une région luminale (19). La partie luminale de la protéine contient deux sites de glycolysation sur l'asparagine 114 et 120. Une fois glycosylée, cette isoforme a un poids moléculaire de 33 kDa sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE. Son nom Iip33 provient de cette caractéristique. La glycosylation rend la molécule plus résistante à la dégradation par les protéases, mais n'influence pas l'assemblage des molécules dans le RE (36,37).

Chez l'homme, on retrouve quatre isoformes de la chaîne invariante : Iip33, Iip35, Iip41 et Iip43. Ces isoformes proviennent du même ARN messager. La production d'une isoforme en particulier dépend de l'initiation de la transcription. La forme p33 est produite par la liaison du ribosome au deuxième codon AUG, alors que la forme p35 contient une extension de 16 acides aminés de la queue cytoplasmique dû à la fixation du ribosome à l'AUG en amont (38-40). La prédominance de l'isoforme p33 vient du fait que la séquence devant le 2e AUG est plus propice à la fixation du ribosome. Cette séquence est appelée la séquence de Kozak (ACCATG) (41). Les autres isoformes sont produites par épissage alternatif : Iip41 et Iip43 possèdent un exon supplémentaire par rapport à p33 et p35 (Figure 1.8)

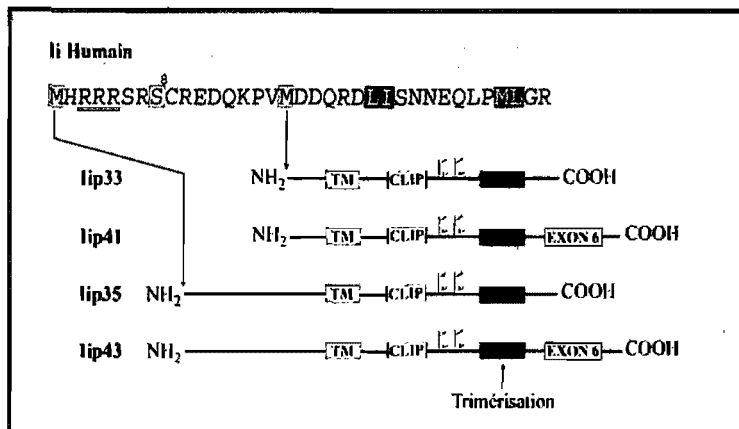


Figure 1.8: Représentation des quatre isoformes de la chaîne invariante

L'initiation alternative de la transcription génère deux ARN messagers différents. Chacun de ces ARNm subira l'épissage alternatif et il en résultera deux isoformes différents. Les arginines soulignées sont responsables de la rétention dans le réticulum. La sérine 8 est phosphorylée dans le réticulum et permet la sortie des molécules. Ces motifs sont présents chez les isoformes lip35 et lip43. Les boîtes en noirs présentes dans la séquence protéique correspondent aux motifs de ciblage de types di-leucines présents chez toutes les formes. Les sites de glycosylation sont indiqués près de la région du CLIP. Les régions de trimérisation et l'exon 6 des isoformes p41 et p43 sont représentés (tiré de 125).

Lors de sa synthèse dans le réticulum endoplasmique la li trimérise pour ensuite permettre aux hétérodimères $\alpha\beta$ de s'y associer. Les sites de trimérisation sont reconnus pour être situés dans la région luminale de la chaîne invariante. L'hélice α en amont de l'exon 6 est responsable de la trimérisation de la molécule. Certaines études ont démontré que des fragments correspondant aux acides aminés 118 à 194 de la chaîne invariante sont suffisants pour trimériser entre eux (42).

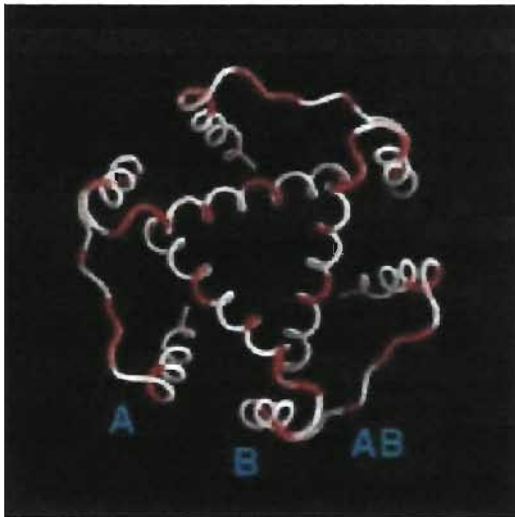


Figure 1.9 : Structure du domaine de trimérisation

Domaine de trimérisation de la région luminale correspondant aux résidus 118-192 est illustrée sous forme squelettique. L'échelle de couleur du blanc au rouge correspond aux résidus plus ou moins conservés. (Tiré de 43).

Cependant, des études de mutagenèse sur des résidus hydrophiles ont démontré que la région transmembranaire semble aussi jouer un rôle important dans la trimérisation de la chaîne invariante. De plus, la partie N-terminale de Ii semble efficace pour trimériser en l'absence de l'hélice α (44,45).



Figure 1.10: Modèle trimérique du domaine transmembranaire de Ii

Structure de la région transmembranaire montrant les résidus Tyr33, Gln47, Thr49, Thr50 et Tyr52 impliquée dans la trimérisation. (Tiré de 45)

1.3.2 Fonctions de Ii dans l'assemblage et le transport des CMH II.

Lors de la synthèse des hétérodimères $\alpha\beta$, leur association avec la chaîne invariante contribue à leur assemblage efficace et stable. La région CLIP de Ii se fixe à la niche peptidique empêchant ainsi les peptides endogènes de s'y lier mais assure aussi le repliement adéquat des molécules (46,47). Les dimères $\alpha\beta$ préformés sont associés à une protéine présente dans le RE, la calnexine. Cette association retient les molécules dans le RE jusqu'à ce que le nonamère $\alpha\beta$ Ii soit complètement assemblé. Ensuite, la calnexine se libère du complexe et laisse celui-ci sortir du RE. La présence de Ii est donc généralement nécessaire à la sortie du complexe du RE (48). De plus, il a été démontré qu'en absence de Ii les molécules de classe II du CMH s'agrègent dans le réticulum (49).

1.3.3 Ciblage intracellulaire des complexes $\alpha\beta$ Ii

En plus de son activité de chaperon, Ii est responsable du ciblage des CMH de classe II vers l'appareil de Golgi et les endosomes. Une fois assemblé, le complexe nonamérique ($\alpha\beta$ Ii)³ se dirige vers le Golgi où il sera glycosylé. Ii possède un motif de type di-leucine situé dans sa région cytoplasmique. Une leucine et isoleucine se retrouvant respectivement à la position 7 et 8 composent le premier signal. Le deuxième motif contient une méthionine et une leucine à la position 16 et 17 (50). Des résidus acides situés devant ces motifs sont requis pour le ciblage vers les endosomes (51). Lors de la mutation de ces résidus, on retrouve les complexes principalement en surface et leur demi-vie est plus longue. De plus, le mécanisme de transport du complexe vers les compartiments endosomaux n'est pas encore clairement défini. Certains groupes ont même démontré que l'absence du complexe de clathrine provoquerait une accumulation de Ii en surface (52,53). De plus, la trimérisation des molécules semble avoir une importance pour le ciblage du complexe vers les endosomes. Une forme tronquée de la chaîne invariante aura un phénotype similaire que la mutation du motif. Par contre, l'absence de ciblage vers les endosomes ne semble pas nuire à la présentation antigénique. Les molécules de classe II du CMH peuvent être réinternées et lier des

peptides antigéniques. La présence de ce signal pourrait avoir l'effet d'augmenter l'efficacité de la présentation antigénique (54).

1.3.4 Rôle de Ii dans la maturation des lymphocytes B

Ces dernières années, une étude a rapporté que Ii aurait un rôle important dans le développement et la maturation des lymphocytes B. Les différents groupes de recherche ne s'entendent pas sur l'action précise de Ii et comment elle interviendrait dans la maturation des cellules B.

Le groupe de Shachar a publié plusieurs études sur l'importance de la queue cytoplasmique. Il a établi un modèle stipulant que, lors de sa protéolyse, Ii libérerait son domaine N-terminal dans le cytoplasme. Ce domaine pourrait activer directement ou indirectement des facteurs de transcription associés aux gènes exprimant NF- κ B. L'expression de ces facteurs permet par la suite d'activer la maturation des lymphocytes B (Figure 1.10). Selon cette étude, le fragment correspondant aux acides aminés 1-42 serait suffisant pour activer l'expression de NF- κ B (50,55). Par contre, la protéolyse de la queue cytoplasmique est nécessaire à l'induction de la différenciation des cellules B (56).

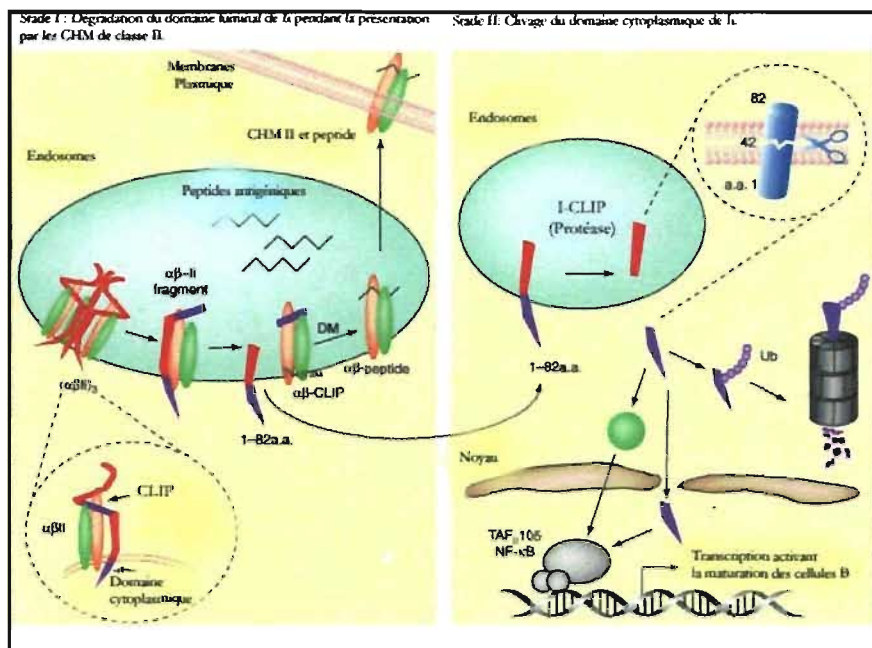


Figure 1.11: Modèle d'activation de NF-κB par la protéolyse de la queue cytoplasmique de Ii

Le fragment de 1-82 est formé avec la protéolyse graduelle lors de la maturation des CMH de classe II. (Stade I). Clivage du domaine transmembranaire libérant la région 1-42 et migration vers le noyau induisant directement et indirectement l'expression NF-κB. (Stade II). (Traduit de 57).

Cependant, d'autres groupes ont mis en doute ces derniers résultats. Bendelac et Ploegh ont étudié ce phénomène avec un modèle de souris déficientes pour $Ii^{-/-}$ et $I\alpha^{-/-}$. Ils ont observé que les cellules B parvenaient à maturation (58,59). L'impact de la chaîne invariante sur la différenciation des lymphocytes B demeure toujours à confirmer.

1.4 : La chaîne invariante p35

1.4.1 : Fonctions et particularités de lip35

Chez l'humain, les CPA expriment des isoformes spécifiques de la chaîne invariante. lip35 et lip43 ne sont pas exprimées chez la souris et le rat. Ces isoformes possèdent une extension cytoplasmique de 16 acides aminés. Nous allons, dans ce mémoire, nous concentrer sur l'isoforme lip35. Il est une molécule exprimée en excès dans les cellules présentatrices d'antigènes. L'isoforme p35 représente 20% de molécules exprimées dans

une cellule donnée. L'extension de la queue cytoplasmique présente chez cette isoforme apporte certaines propriétés supplémentaires à la chaîne invariante (60).

Iip35 a un rôle de rétention dans le réticulum endoplasmique. Les trimères de Ii ne peuvent sortir du RE puisqu'un motif de rétention de type di-arginine (R-X-R) se retrouve à la position 3-X-5 (61,62). Cette rétention ne peut être contrecarrée que par l'association du trimère avec les molécules du CMH II. Un seul isoforme p35 présent dans un trimère est nécessaire pour retenir le complexe (63). Des études récentes de notre laboratoire ont démontré que seule la chaîne β est essentielle au masquage et qu'une forme tronquée de cette chaîne possédant seulement trois résidus cytoplasmiques près de la région transmembranaire est suffisante pour rétablir la sortie du complexe (64).

La rétention des protéines au réticulum endoplasmique peut être envisagée de deux façons : soit par la présence d'un signal provoquant le retour des protéines qui ont migré au Golgi ou soit par un motif qui empêche la sortie de la protéine. Le motif di-arginine R-X-R fait partie du premier type de rétention. Son rôle serait d'assurer le bon assemblage et le repliement adéquat des protéines retenues. Ce motif di-basique est caractéristique de certaines protéines autre que Ii : des protéines tel le récepteur GABA ou NMDA possèdent aussi ce motif (65,66). Le transport rétrograde des protéines implique leur association avec les vésicules COP-1. De plus, la protéine adaptatrice 14-3-3 serait impliquée dans la libération des molécules (67) (Figure 1.13).

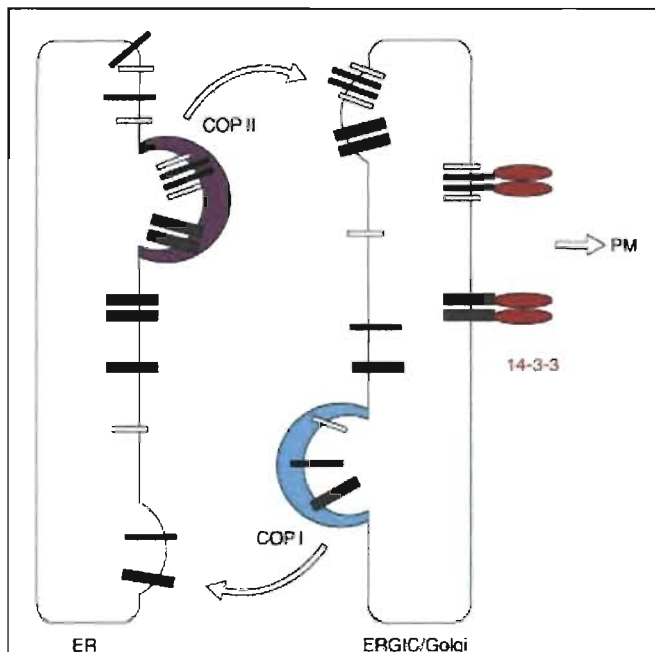


Figure 1.12: Modèle de régulation de la sortie des protéines par 14-3-3

La protéine 14-3-3 se lie se au motif arginine de la protéine et la retient au RE jusqu'à ce qu'elle soit assemblée correctement et que le motif soit masqué. Les protéines correctement assemblées seront exportées par COPII alors que les sous-unités protéiques qui aurait sorti du RE y seront retournées par COPI (Tiré de 68).

La chaîne invariante p35 possède deux résidus sérines à la position 6 et 8. Ces sérines ont la particularité d'être phosphorylées (69). Cette modification permet la fixation de 14-3-3 qui est nécessaire à la sortie des complexes du RE. La sortie du complexe $\alpha\beta$ li du réticulum semble donc être contrôlée par la phosphorylation de lip35 (38).

1.4.2 : Phénotype relié au déséquilibre du ratio de l'expression de lip33 et de lip35

D'autre part, l'expression des isoformes semble important dans le maintien de l'homéostasie immunitaire. Certaines études ont démontré qu'en l'absence de la chaîne invariante lip35, les nanomères CMH II-lip33 tendent à se rendre directement à la surface cellulaire avant de rejoindre les endosomes (70). Ceci ayant comme impact une augmentation du nombre de molécules de classe II du CMH à la surface n'étant pas chargées de peptide antigénique. En plus, un changement dans le ratio entre les deux

isoformes montre une différence dans le temps et le moment de la sortie du RE. La présence de Iip35 influence la qualité et la complexité de la glycolysation puisqu'elle permet un passage plus lent dans le Golgi. Effectivement, puisque dans les cellules exprimant exclusivement l'isoforme p33, les molécules démontrent une résistance à l'endoglycosidase H et ont des patrons simples de glycosylation (61,71). Le ciblage vers différents compartiments, le taux de liaison peptidique et la vitesse de dégradation endosomale vont être touchés indirectement par les différents sucres (70,72). De plus, le transport intracellulaire des complexes a été montré plus rapide en présence de Iip33 seulement alors qu'il est très lent avec les complexes contenant que Iip35 (73). L'influence du taux d'expression des isoformes semble être importante au niveau de la présentation antigénique.

1.4.3 Les pathologies associées à Iip35

Différentes pathologies humaines ont été associées à l'expression inadéquate de Iip35. La leucémie est un premier exemple. Le groupe de Veenstra a démontré que l'expression de l'isoforme p35 était augmentée dans des cellules de patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique : CLL (Chronic Lymphocytic Leukemia,(74)). L'effet de la surexpression de Iip35 n'est pas à ce jour précisé, mais une diminution de la présentation des antigènes tumoraux pourrait expliquer la persistance de la maladie. Un excès de Iip35 peut saturer la capacité de phosphorylation engendrant une augmentation de la rétention des CMH de classe II au niveau du réticulum (75).

L'effet de la diminution de l'expression de Iip35 a en plus été reliée à une autre pathologie très répandue : le diabète de type I. Le groupe de Faust a démontré que des cellules de patients diabétiques expriment un faible taux de Iip35 et que la transfection de cette protéine dans ces cellules restaurait les défauts de présentation antigénique (76).

1.5 : Les souris «knock out » *Ii*^{-/-}

Dans le but de mieux comprendre la fonction de la chaîne invariante, certains groupes ont établi une lignée de souris transgéniques déficientes « knock out » (KO) pour *Ii*. Ils ont produit ces souris par recombinaison homologe dans des cellules souches embryonnaires. Ce qui a comme impact de muter le gène et d'inhiber son expression. Cet outil très utile a permis de mieux comprendre l'importance du rôle de *Ii* dans la présentation antigénique par les molécules de classe II du CMH (26,77-79)

Les premiers résultats démontrèrent qu'en l'absence de *Ii*, les molécules de classe II du CMH montraient un transport cellulaire aberrant et une diminution de leur expression en surface. De plus, la conformation des hétérodimères $\alpha\beta$ ne correspondait pas à la conformation compacte mature de ces molécules. Les résultats démontraient une sensibilité accrue des complexes au SDS (77,79). Cependant, l'association des chaînes $\alpha\beta$ ne dépendait pas de la présence de *Ii*. Ce défaut de conformation avait donc comme conséquence une agrégation des complexes au niveau du RE (26). De plus, l'absence de la chaîne invariante ne provoquait pas la liaison des peptides endogènes présents dans le RE puisque la conformation du complexe ne favorisait pas l'association de peptide à la niche. Conséquemment, le niveau de molécules de CMH de classe II en surface avait diminué considérablement et la majorité des complexes avaient une niche peptidique vide.

Les souris transgéniques mutantes pour la chaîne invariante avaient un phénotype particulier. Ces souris présentaient un défaut de présentation antigénique qui s'expliquerait par le faible niveau d'expression des molécules de classe II du CMH en surface. Cependant, ces complexes en surface avaient la capacité de présenter certains antigènes lors d'essais *in vitro* de présentation antigénique utilisant des cellules spléniques (77). De plus, les souris « knock out » *Ii*^{-/-} démontraient une diminution de la population de cellules T CD4⁺ présentes dans le thymus et en périphérie (77). La sélection positive des lymphocytes T semble donc être altérée. Cependant, cette diminution ne semble pas affecter la réponse T_H1 induite par les molécules de classe II du

CMH. La différence serait plutôt observée au niveau des cytokines exprimées, les cellules provenant de souris de type sauvage sécrètent de l'interleukine 4 et de l'interféron γ alors que les souris $Ii^{-/-}$ sécrètent seulement de l'interféron γ (80). De plus, le groupe de Shachar a démontré que l'absence de Ii avait un impact sur la maturation des lymphocytes B. Les résultats démontraient un arrêt du développement des cellules B périphériques au stade immature : principalement au stade un de transition. Cependant, ce blocage était indépendant de l'expression des molécules de classe II du CMH. L'immunisation des souris $Ii^{-/-}$ montrait une diminution significative de la production d'IgM (81).

D'autres part, ces phénotypes provoqués par l'absence de Ii pouvaient être en partie rétablis lorsque des souris transgéniques n'exprimant qu'une isoforme murine soit $Iip31$ ou $Iip41$ étaient produites à partir de souris « knock out » $Ii^{-/-}$. La présence d'une seule isoforme semble suffisante pour restaurer la présentation antigénique ainsi que la population de cellules T $CD4^{+}$ en périphérie. On retrouvait en plus une augmentation de la conformation compacte des hétérodimères. Cependant, l'expression en surface des molécules CMH II et la population de cellules T $CD4^{+}$ dans le thymus étaient toujours faibles. Cette restauration de la fonction était donc partielle dans ce modèle (82).

Cependant, ces observations faites sur les souris $Ii^{-/-}$ ne sont pas constantes et semblent dépendre de l'allèle des molécules de CMH de classe II exprimé. Les souris $H-2^b$ avaient un phénotype typique des souris $Ii^{-/-}$ et exprimaient donc un important déficit dans la présentation antigénique, la population des cellules T $CD4^{+}$ et dans la maturation des cellules B. Cependant, les souris $Ii^{-/-}$ sur un fond génétique $H-2^k$ ou $H-2^d$ avaient un phénotype qui se rapprochait plus des souris de type sauvage. Ces souris exprimaient un niveau de molécules du CMH II en surface comparable aux souris de type sauvage (83).

1.6: Les souris transgéniques HLA.

Plusieurs modèles de souris transgéniques ont été établis pour mieux comprendre les facteurs génétiques des maladies auto-immunes et ainsi que les haplotypes de HLA qui favorisent ces pathologies. Plusieurs groupes ont fait des souris humanisées pour

différents HLA. Les souris HLA-DQ8 montraient une susceptibilité accrue à l'arthrite induite par le collagène de type II (CIA) alors que les souris exprimant HLA-DR β 1 les protégeaient contre cette maladie. D'autres maladies, comme le diabète de type 1 ont démontré une spécificité allélique pour certains HLA. Ce type de diabète est associé à allèle DQ8 mais l'allèle DQ6 semble être protecteur. La production de souris humanisées pour chacun de ces allèles a permis de confirmer cette théorie en permettant l'étude des épitopes reconnus par les cellules T (84). L'établissement de souris transgéniques permet donc d'avoir des réponses plus précises sur certaines pathologies en observant un organisme complet.

1.6 : Les anticorps polyclonaux

La réponse immunitaire dite acquise se divise en deux principales voies : la réponse humorale et la réponse à médiation cellulaire. La réponse humorale est caractérisée par la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B. Les immunoglobulines peuvent être membranaires et servir de récepteurs à l'antigène pour les cellules B. Cependant, la forme prédominante des immunoglobulines est sérique. C'est une fois différenciées en plasmocytes que les cellules B sécrèteront les anticorps dans le sang.

Le rôle principal des anticorps se situe au niveau de la liaison et de la neutralisation des antigènes ainsi qu'au niveau de l'activation du complément. Les anticorps solubles produits suite à une réponse contre un microorganisme ou une toxine donnés sont hétérogènes. Les antigènes possèdent plusieurs déterminants antigéniques et quelques uns d'entre eux induiront la production d'anticorps. Chaque lymphocyte B est spécifique pour un épitope précis de l'antigène et son activation provoque une expansion clonale. Les clones de lymphocytes B différenciés en plasmocytes produisent des anticorps monoclonaux. C'est-à-dire qu'ils reconnaissent tous le même épitope antigénique. L'ensemble des réponses par les différents plasmocytes sériques constitue la production polyclonale.

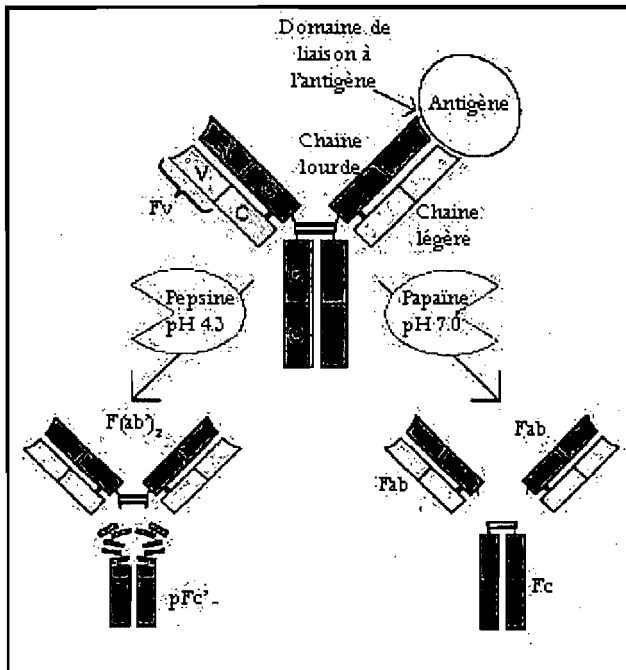


Figure 1.13: Représentation de la structure générale des immunoglobulines

Chaque chaîne contient une région variable (V) et une ou plusieurs régions constantes (C) liées entre elles par des liens covalents. Des ponts disulfures lient les chaînes lourdes aux chaînes légères. Le domaine de liaison de l'antigène se situe aux extrémités N-terminales et le domaine dit « effecteur » se retrouve à l'extrémité COOH. À pH 4, la pepsine peut fragmenter le domaine Fc de l'anticorps. Au pH physiologique, la papaïne peut séparer les domaines Fab et Fc en brisant les ponts disulfures. (Adapté de 85)

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines formées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques. Chaque chaîne légère est associée à une chaîne lourde par un pont disulfures et des liaisons non covalentes. Chacune des chaînes légères contient une région variable (V) et une région constante (C) alors que les chaînes lourdes sont constituées d'une région variable (V) et de plusieurs régions constantes (C). La forme des anticorps est souvent représentée par un « Y ». Cette représentation illustre bien les domaines Fab (représenté par les bras du « Y ») et le domaine Fc. Ce sont les régions variables présentes dans les domaines Fab qui reconnaissent un épitope spécifique de l'antigène. De plus, le domaine Fc détermine l'activité biologique de l'anticorps telle l'activation des cellules NK (natural killer), l'activation du complément et la phagocytose (Figure 1.14). Chez les mammifères, les immunoglobulines sont divisées en cinq classes : les IgG, les IgD, les IgE, les IgA (principalement retrouvées sous forme de dimères) et les IgM (sous forme de

pentamères). Lors de production d'anticorps sériques, ce sont les IgG qui sont retrouvés en plus grand nombre (85).

Bien que la production d'anticorps soit essentielle à la défense de l'organisme, les chercheurs ont vu très tôt leurs utilités dans le milieu scientifique. Grâce à leur haute spécificité, les anticorps ont permis le développement de plusieurs techniques tant au niveau fondamental qu'appliqué. Des techniques comme l'immunobuvardage, l'immunoprécipitation, la cytométrie en flux, l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), la cristallographie par rayon X, l'immunofluorescence, etc. sont très répandues, très utiles et ne seraient possibles sans anticorps (85).

Autant dans le domaine médical que scientifique, les anticorps utilisés peuvent soit être monoclonaux ou polyclonaux. Les anticorps monoclonaux utilisés en laboratoire proviennent d'une technique perfectionnée par Köhler et Milstein qui leur a valu un prix Nobel. Cette technique consiste à fusionner des lymphocytes B producteurs d'anticorps avec des cellules myéломateuses formant ainsi des hybridomes immortels et producteurs d'anticorps. Les anticorps produits par les clones d'un hybridome sont appelés monoclonaux puisque qu'ils proviennent d'un même plasmocyte cloné. Ils sont donc tous spécifiques au même épitope antigénique. Par contre, les anticorps polyclonaux sont le résultat de la réponse immunitaire humorale lors de présence d'un antigène. Ils constituent ainsi un mélange hétérogène de plusieurs anticorps spécifiques pour différents épitopes. Dépendamment des besoins, les groupes de recherche utiliseront des anticorps monoclonaux ou polyclonaux. Bien que les anticorps monoclonaux soient homogènes, leur liaison peut être plus facilement altérée par la température, le pH, la conformation ou la dénaturation de la protéine. La production d'anticorps polyclonaux sera donc privilégiée dans ce mémoire. Les changements de conformation des protéines influencent très peu la détection par les anticorps polyclonaux puisque ceux-ci reconnaissent plusieurs épitopes. De plus, les anticorps polyclonaux sont plus rapides et moins dispendieux à produire. Ils détectent généralement les antigènes plus intensément que les anticorps monoclonaux puisque leur hétérogénéité augmente le nombre d'épitopes

reconnus. Cependant, cet avantage peut devenir un inconvénient dans certaines situations où l'hétérogénéité va favoriser des réactions croisées (86-88).

La production d'anticorps polyclonaux en laboratoire se fait couramment. Les mammifères utilisés sont principalement les moutons, les chèvres et les lapins. Le choix dépend du volume d'anticorps voulu. Les lapins sont généralement utilisés car ils produisent un volume plus important de sérum. De plus, leur manipulation et entretien demandent moins de coûts. Puisque les souris produisent un faible volume de sérum, elles sont essentiellement utilisées dans la production d'anticorps monoclonaux. La fusion des lymphocytes B doit se faire avec des cellules de la même espèce, et les myélomes disponibles sont principalement produit chez la souris et le rat (85). Le choix du type de production d'anticorps dépend donc des besoins expérimentaux du groupe de recherche.

1.7 : Objectifs et hypothèses

Les maladies auto-immunes sont causées par un dérèglement de la discrimination du soi et du non soi. L'expression de certains allèles molécules HLA de classe II représentent un facteur de risque important dans ces pathologies (89). La présentation de certains peptides lors de la sélection thymique pourrait engendrer des lymphocytes T autoréactifs. Dépendamment des allèles HLA exprimés chez certains individus, la présentation de peptides autoréactifs sera favorisée et induira l'auto-immunité. La présentation de certains peptides semblent donc plus susceptible de provoquer des maladies (90). D'autre part, la synthèse et l'expression adéquate des molécules de classe II du CMH dépend de la présence de la chaîne invariante. Elle permet la discrimination entre la présentation de peptides endogènes (CMH I) et exogènes (CMH II). Le ratio d'expression des isoformes Iip33 et Iip35 semble aussi être impliqué dans certaines pathologies comme la leucémie et le diabète de type 1.

Nous avons donc émis l'hypothèse que la dérégulation de l'expression de Iip 35 affecte le ciblage intracellulaire des molécules de classe II et modifie le répertoire des peptides

antigéniques. Par exemple, pour des allèles impliqués dans les maladies auto-immunes tel HLA-DQ8 dans le diabète, il y aurait augmentation du risque d'activation de cellules T autoréactives.

Le premier objectif est d'établir une lignée de souris transgéniques exprimant Iip35. Pour ce faire, nous avons optimisé la séquence Kozak autour de l'ATG de Iip35 et cloné cette isoforme dans un vecteur d'expression sous le contrôle du promoteur Ii murin. Puisque les souris sont dépourvues de cette isoforme, cette construction rendra possible la génération de souris transgéniques exprimant Iip35. Cet outil permettra donc d'étudier l'impact de Iip35 sur les fonctions du système immunitaire.

Le deuxième objectif est de produire un anticorps polyclonal spécifique à l'isoforme Iip35. Les anticorps disponibles ne font pas la discrimination entre la chaîne invariante Iip33 et Iip35. Un peptide synthétique correspondant à l'extension cytoplasmique de Iip35 a servi pour la production d'anticorps. La production d'un anticorps spécifique à Iip35 sera très utile dans différentes expériences et facilitera la caractérisation fonctionnelle de Iip35.

Chapitre 2: Procédures expérimentales

2.1 : Établissement de lignées de souris transgéniques *lip33* et *lip35*

2.1.1 Stratégie de clonage et PCR

Dans une première étape, nous avons optimisé la séquence de Kozak (gCCgCCATgC) devant le premier AUG pour permettre la fixation efficace au ribosome. La séquence précédant le codon de départ pour la traduction de *lip35* n'est pas optimale (CCAgATgC) (91). Nous avons donc produit une mutation pour obtenir la séquence gCCgCC devant l'ATG (souligné dans la séquence des oligos B et C ci-dessous). Plusieurs réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été nécessaires pour l'introduction de mutations lors de la construction d'un plasmide exprimant seulement *lip35* (92). Le premier PCR amplifiait et introduisait la mutation permettant d'optimiser la séquence de Kozak avec l'utilisation de l'amorce « Universal » (5'GTAAAACGACGGCCAGT3') pour le plasmide pBluescript ®IIKS +/- (BsKS) (2.26Kb) (Stratagene, Canada) et l'amorce (B): 5'CCGGAGGATCCTGCCGCCATGCACAGGA3' (synthétisée chez Alpha DNA). Cette séquence permet l'insertion du site de restriction *BamHI* (*en italique* dans la séquence des oligos B et C ci-dessus). Parallèlement, un second PCR a été fait avec les amorces «Reverse» (5'AACAGCTATGACCATG3') et une deuxième amorce (C) 3'GGCCTCCTAGGACGGCGGTACGTCTCCT5'. Les produits de ces deux PCR ont servi pour en faire un troisième avec les oligos « Universal » et « Reverse ». Le produit final de ce dernier PCR a été cloné dans le site de restriction *PstI* du vecteur pBsKS. Le cDNA de la chaîne invariante, exprimé dans le vecteur pBsKS, (obtenu du Dr Rafick Sékaly, (93) qui a été utilisé pour cette réaction de PCR avait déjà subi une mutation dans le deuxième codon de départ (Met17→ Ala) assurant ainsi la traduction unique de *lip35* (94). *lip35* allait ensuite être sous-cloné dans un vecteur d'expression eucaryote pDOI-6 au site de restriction *Clal* (provenant du Dr. N. Labrecque, Université de Montréal) (95). Pour se faire, il a fallu insérer un site *Clal* dans le vecteur pBsKS. Les enzymes de restriction *HincII* et *Ecl 136II* (isoschizomère de *SacII*) ont coupé le fragment contenant li et incluant ainsi le site *Clal* de pBsKS. Cet insert *lip35 Clal* a été introduit dans la polarité inverse au site *EcoRV* d'un vecteur pBsKS vide, générant ainsi un site de

restriction *Clal* de chaque côté de l'insert Iip35 (Kozak). Celui-ci a pu être ensuite inséré dans le site *Clal* du vecteur eucaryote pDOI-6. Cette même stratégie (Figure 3.1) a aussi été effectuée pour Iip33. Parallèlement, une construction similaire dans pBud-CE4 (Invitrogen, Canada) a été établie pour s'assurer de la fonctionnalité de la séquence de Kozak dans des systèmes de transfection in vitro. L'insert Iip35 optimisé pour la région Kozak a été coupé au site *BamHI* pour l'exciser de pBSkS et l'insérer dans le site de restriction de *BlgII* de pBud. Tous les clones obtenus ont été séquencés (Services de séquençage, CHUM, Montréal, Québec).

2.1.2 Lignées cellulaires et transfections :

Les cellules HEK 293T (obtenue du Dr E. Cohen, Université de Montréal) ont été cultivées dans le milieu DMEM (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) contenant 5% FBS (sérum de veau fœtal; Wisent). L'expression transitoire de Iip35 était faite par la méthode de co-précipitation au phosphate de calcium ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) utilisant 2µg de chaque plasmide. Un million de cellules ont été comptées et laissées adhérer pendant 24 heures. L'ADN a été mise en contact avec les cellules dans une solution de calcium et les cellules ont été analysées 48 heures après la transfection (126).

2.1.3 Anticorps

Les anticorps suivants ont été utilisés : BU45 (IgG1) est un anticorps monoclonal spécifique pour la région C-terminale de Ii humain (The Binding Site, Birmingham, UK). PIN-1 est un anticorps monoclonal (79) qui reconnaît le domaine N-terminal de la queue cytoplasmique de Iip33 et Iip35. Les anticorps de chèvre contre les IgG de souris et de lapins sont couplés à un fluorochrome (Alexa Fluor488 ou 633®; Molecular Probes, OR). L'anticorps anti-B-220 couplé au FITC lie le CD45 des cellules B murines (Catalog Laboratories, CA). Des anticorps de chèvre contre les IgG de souris et de lapins couplés à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) ont été utilisés pour les immunobuvardages.

2.1.4 Expression des plasmides pDOI-6p33 et p35

Les marquages intracellulaires de Ii ont été effectués par perméabilisation avec de la saponine (96). Les cellules HEK 293T sont lavées, fixées avec du paraformaldéhyde 4% et perméabilisées avec 0.05% de saponine (Sigma, CA) contenant 1% de sérum d'albumine bovine (97). Les cellules ont été analysées au cytomètre en flux (FACSCalibur; Becton Dickinson, Canada).

2.1.5 Préparation de l'ADN plasmidique pour microinjection dans des œufs fertilisés de souris.

Une fois séquencés, les plasmides pDOI6-p33 et pDOI-p35 ont été préparés à grande échelle (Maxiprep; Sigma, USA). Cinquante µg de chaque plasmide ont été digérés aux sites *XhoI* et *PvuI* générant ainsi un fragment de 7 500 pb. L'ADN a ensuite été extrait du gel d'agarose (Sephaglas, Amersham, CA). Par la suite, une dernière purification sur colonne (ELUTIP-D; Watman, UK) a été faite avant l'injection de l'ADN. Les ADN ont été microinjectés par le service de transgénèse de l'IRIC à Université de Montréal.

2.1.6 Criblage des souris transgéniques

2.1.6a Criblage par Southern Blot :

L'extraction de l'ADN génomique s'est fait à partir d'un bout de queue d'environ 1 cm digéré dans une solution de TRIS 10mM pH 8, EDTA 5mM, SDS 1% NaOAc 0.3M et contenant 200µg/ml de protéinase K (Amersham, CA) à 55 °C toute la nuit et extrait par la méthode de phénol (saturé en Tris) et chloroforme. Quinze µg d'ADN génomique ont été digérés 18 heures à 37°C par l'enzyme *BamHI*. Les fragments ont été séparés sur un gel d'agarose 0,8%. Le transfert sur membrane de nylon (Nytran supercharge, VWR) s'est fait par capillarité pendant 18 heures (98). Par la suite, la sonde servant à l'hybridation a été préparée en coupant le plasmide pDOI6-p35 avec l'enzyme *BamHI*,

généralant ainsi un fragment d'environ 700pb. Ce dernier fragment a été utilisé comme sonde après marquage au ^{32}P en présence du fragment de Klenow de l'ADN polymérase (New England Biolabs). La sonde a été purifiée sur colonne de shépharose G50, dénaturée au NaOH 2N avant l'hybridation qui a été effectuée à 65 °C (98).

2.1.6b Criblage par PCR :

L'ADN génomique a été extrait à partir d'un bout de queue de 1 cm à l'aide de l'ensemble commercial d'extraction d'ADN génomique (GenEluteTM Mammalian genomic DNA Miniprep Kit, Sigma, USA). La présence de transgènes dans le génome des souris a été vérifiée par PCR en utilisant des nucléotides correspondant au N-terminale de Ii (CAAACtGACAgTCACCTC) et à la région du plasmide en C-terminale (gAAgTCAgATgCTCAAgg) .

2.1.6 Expression des transgènes

Un échantillon de sang d'environ a été prélevé par le bout de la queue. Le sang a été récolté dans un tube contenant de l'EDTA 2mM pour empêcher sa coagulation. Les lymphocytes B ont été extraits du sang des souris positives pour le transgène Iip33 ou Iip35 par centrifugation en présence de Ficoll (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada). Par la suite, un double marquage à été fait avec les anticorps B220 couplé à FITC et Bu45 marqué au GAM (Goat anti-mouse) Alexa 633 pour vérifier l'expression des transgènes par cytométrie en flux. Les cellules ont été fixées et perméabilisées comme décrit plus haut pour les marquages intracellulaires. Une étape supplémentaire de marquage en surface a été faite pour le marquage avec l'anticorps B-220-FITC. Après avoir été lavées, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (FACSCalibur; Becton Dickinson, Mississauga, Canada).

2.2 Production d'anticorps polyclonaux anti-lip35

2.2.1 Synthèse et couplage du peptide :

Huit mg de peptides (16 acides aminés de la queue cytoplasmique de lip35 plus une cystéine (en gras) pour permettre le couplage) : MHRRRSRSCREDQKPVC (provenant du service de synthèse de peptides de l'Est du Québec, CHUL, Québec) ont été couplés à huit mg de KLH (Keyhole Limpets Hemocyanin, Sigma, USA). Le couplage a été effectué en présence de 0.3% de glutaraldehyde. Pour assurer une immunisation adéquate, le produit du couplage peptide-KLH a été purifié par dialyse.

2.2.2 Immunisation des lapins

L'immunisation de deux lapins (New Zealand White, Charles River) s'est faite par émulsion de 0.6mg du complexe peptide-KLH avec l'adjuvant de Freund complet (Sigma,USA) dans une proportion de 1 :1 (87). Une injection de 0.3ml d'adjuvant de Freund complet et 0.3ml de peptides a été faite par la voie sous-cutanée lors de la première immunisation (87). Un prélèvement de 10 ml de sang a été réalisé avant la première immunisation et ensuite, à intervalle de sept jours. Deux doses subséquentes d'immunisation ont été administrées en sous-cutané tous les 21 jours (jusqu'à production d'anticorps voulue). Les rappels ont été faits avec la même dose de peptide mais avec l'adjuvant incomplet de Freund. Les lapins ont été sacrifiés par ponction cardiaque permettant de récupérer 45ml de sérum. L'analyse de la production d'anticorps a été évalué la technique d'ELISA

2.2.3 Détection de la production d'anticorps par ELISA

L'antigène (peptide de la queue de lip35 et KLH) a été adsorbé à 4 °C durant 16 heures au fond des puits d'une plaque de 96 puits et ce dans un tampon de chargement NaHCO₃ de 50mM à pH 9.6. Les sites non spécifiques ont été bloqués par une incubation d'une

heure à 37°C dans une solution de PBS-lait 0.5%. Les sérums récoltés des prélèvements sanguins furent dilués avec du PBS 1X selon les concentrations suivantes : N-D (non dilué), 1 :50, 1 :100, 1 :250, 1 :500 et 1 :1000. Le contrôle positif représente un anticorps de lapin anti-Iip35 (obtenu du Dr Peter Cresswell, Université Yale). L'anticorps secondaire anti-Ig de lapin couplé à la peroxydase a été dilué 1 :1000 dans le PBS-lait 0.5%. Une autre incubation d'une heure à 37°C a suivi. La coloration avec 150µl d'une solution d'OPD (O-phénylène diamine) dans un tampon citrate révèle la présence d'anticorps selon l'intensité de la coloration. La réaction est ensuite arrêtée avec 50µl d'acide sulfurique 2M. La densité optique est lue à une longueur d'onde de 495nm.

2.2.4 : Titrage et caractérisation de l'anticorps par gel d'acrylamide SDS-PAGE.

2.2.4.a) Lysat cellulaire :

L'extraction des protéines totales a été réalisée à partir de cinq millions de cellules HEK 293T (contrôle négatif) ou de 293T transfectées de façon stable avec Iip35 (99). Les cellules ont été lysées en présence de Triton-X-100 1%. Le surnageant a été récupéré après centrifugation à 14 000g pour 10 minutes.

2.2.4.b) Séparation du lysat cellulaire par gel de polyacrylamide SDS-PAGE.

Le lysat cellulaire (20µl dans un tampon réducteur Laemli 1X) a été bouilli cinq minutes et chargé sur un gel SDS-PAGE 12%. Les protéines ont été transférées sur une membrane Hybond ECL (Amersham, Canada). La membrane a été incubée avec une dilution 1:500 de sérums provenant des lapins et différentes dilutions des anticorps purifiés. L'anticorps PIN-1 a été utilisé pour témoin positif. La détection s'est faite avec un anticorps secondaire de chèvre couplé à la peroxydase (anti-lapin et anti-souris; Bio/Can. Scientific, Ont. Canada) Le signal a été révélé par « chemiluminescence » (Boehringer-Mannheim, Allemagne) sur des films Kodak XAR-5.

2.2.5 Purification d'anticorps

La purification du sérum a été réalisée sur 6 ml de sérum contenant un titre ELISA de 1:1000. Le sérum a été déposé sur une colonne de sépharose non couplée (Amersham, CA). Il a été récupéré et mis sur colonne de sépharose 4B CNBr-activé (Amersham, CA) qui avait préalablement été couplée au peptide correspondant aux 16 acides aminés de la queue cytoplasmique de Iip35. Dix mg de peptides ont été couplés à l'aide d'une solution de NaHCO_3 de 0.1M à pH 8.3 et de NaCl de 0.5M. Le couplage s'est fait durant 16 heures à 4°C en rotation constante. Ensuite, les sites libres ont été bloqués dans une solution de Tris-HCl de 0.1M à pH 8. Après de multiples lavages, le sérum a été appliqué deux fois sur la colonne pour maximiser la liaison. Après 2 lavages, l'anticorps a été élué dans l'acide citrique de 0.1M à pH 2.7. Des fractions de 500µl ont été récupérées dans un microtube contenant 140µl de TRIS de 1M à pH 9 permettant de tamponner les échantillons à pH 7. La densité optique des fractions a été lue à une longueur d'onde de 285 nm. Les fractions correspondant au pic d'absorption ont été mélangées et dialysées contre plusieurs volumes de PBS.

Chapitre 3: Résultats

3.1 : Production de lignées de souris transgéniques *lip33* et *lip35*

3.1.1 Construction d'un vecteur murin servant à l'expression exclusive de *lip35* ou *lip33*

L'association du ribosome à l'ARN messenger peut être optimisée par la présence d'une séquence en amont du codon de départ. La séquence de Kozak (gCCgCCATgC) a été décrite comme une séquence consensus qui favorise la traduction et l'expression des protéines. Dr M. Kozak a démontré que la présence d'une pyrimidine position -3 augmentait considérablement la liaison du ribosome. Ses résultats ont pu confirmer que cette séquence augmentait de façon importante la synthèse protéique (100). La position -3 (en gras) du gène de *lip35* est occupée par une cystéine suivit d'une adénine et d'une guanine (91). Nous avons donc produit une mutation pour obtenir la séquence optimale suivante : gCCgCCATgCAA... Pour ce faire, nous avons débuté par la production de plusieurs PCR optimisant la séquence de Kozak et permettant l'augmentation de l'affinité du ribosome. Le plasmide de départ était pBsKS contenant exclusivement la chaîne invariante p35 mutée au deuxième codon de départ (Met17→Ala), une construction déjà établie par Dr. H. Khalil (101).

Par la suite, chacune des constructions ont été faites à partir de plasmides pBsKS exprimant exclusivement une isoforme. Il a été excisé du plasmide par les enzymes *HincII* et *Ecl 136II* (isoschizomère de *SacII*). Une étape supplémentaire de clonage était nécessaire pour générer un site de restriction *ClaI* de chaque côté du fragment. Pour ce faire, les fragments ont été insérés en polarité inverse au site *EcoRV* d'un plasmide pBsKS vide (Figure 3.1). Finalement, les segments d'ADN ont pu être coupés et insérés au site *ClaI* du vecteur murin pDOI-6. Ce vecteur contenant le promoteur du gène *li* murin a été construit à partir du vecteur pDOI-5 et optimisé pour son expression dans les CPA murines (102) (Figure 3.1 B). Cette stratégie a été suivie pour établir un clone *lip35*-kozak et *lip33*. La construction p33 exprime exclusivement cette isoforme. Cette dernière servira de contrôle lors de l'établissement de souris transgéniques. Nous avons réussi à obtenir des clones positifs pour pDOI-6p33 et p35-Kozak. Le criblage des clones

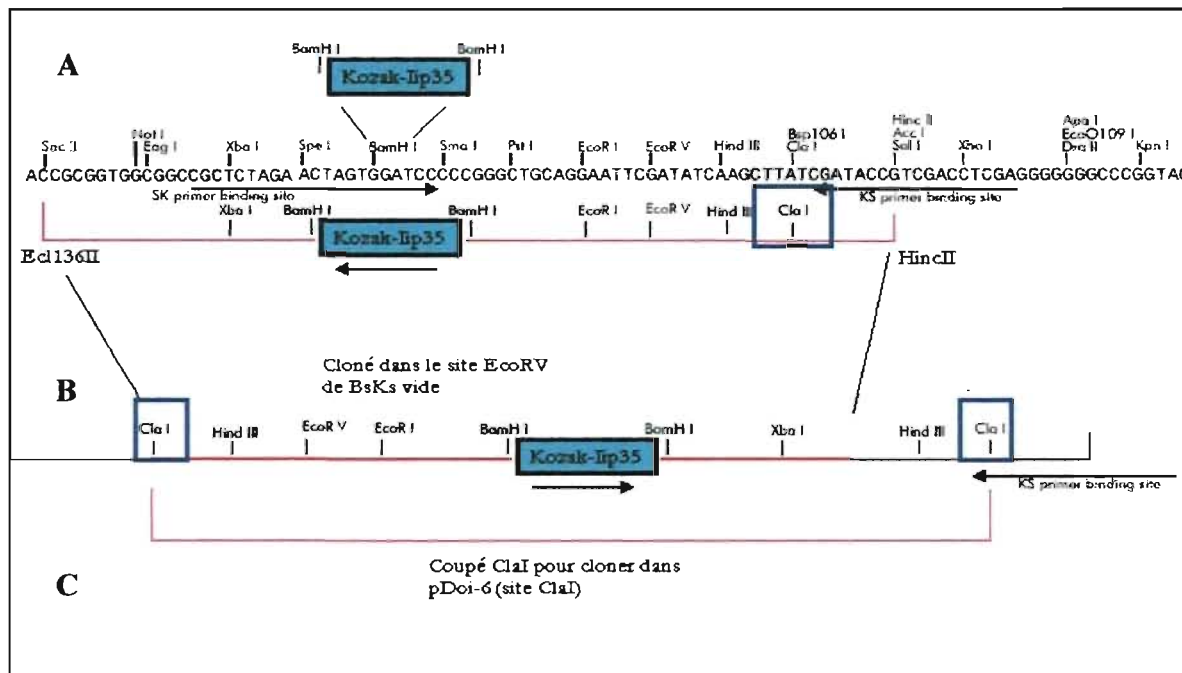


Figure 3.2 : Schématisation des étapes de la stratégie de clonage lip33 et lip35 Kozak.

A) Section du site de clonage multiple de BsKS contenant lip35 (en turquoise) avec la séquence de Kozak optimisée ainsi que la mutation dans le deuxième ATG permettant l'expression sélective de lip35. L'excision avec les enzymes *HincII* et *Ecl136II* (coupe au site *SacII*) permet de conserver dans le fragment le site de restriction *ClaI* (encadré bleu). B). Le segment d'ADN coupé est par la suite inséré en sens inverse dans le site *EcoRV* d'un plasmide BsKS vide générant un site *ClaI* de chaque côté de l'insert (encadrés bleus). C) Ce fragment a été coupé avec *ClaI* permettant son insertion dans le site *ClaI* de pDOI-6, un vecteur eucaryote. La même stratégie a été suivie pour lip33.

3.1.2 Expression des constructions plasmidiques

Dans un premier temps, nous avons vérifié la construction pBudlip35-Kozak afin de vérifier son intégrité. Le plasmide a été transfecté dans des cellules HEK 293T par coprecipitation au $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Après 48 heures, les cellules ont été lavées et fixées. Par la suite, elles ont été perméabilisées avec de la saponine et li a été détectée avec l'anticorps BU45. Un tel marquage intracellulaire permet de déterminer l'expression totale de la chaîne invariante. Comme contrôle négatif, des cellules 293T ont été transfectées avec le plasmide pBud vide. Le marquage des cellules transfectées avec pBudlip35-Kozak démontre une forte expression et permet de confirmer l'efficacité de la séquence mutée (Figure 3.3). L'utilisation du plasmide pBud permet l'expression constitutive de li contrairement au plasmide pDOI-6 qui nécessite la présence d'un activateur de la transcription.

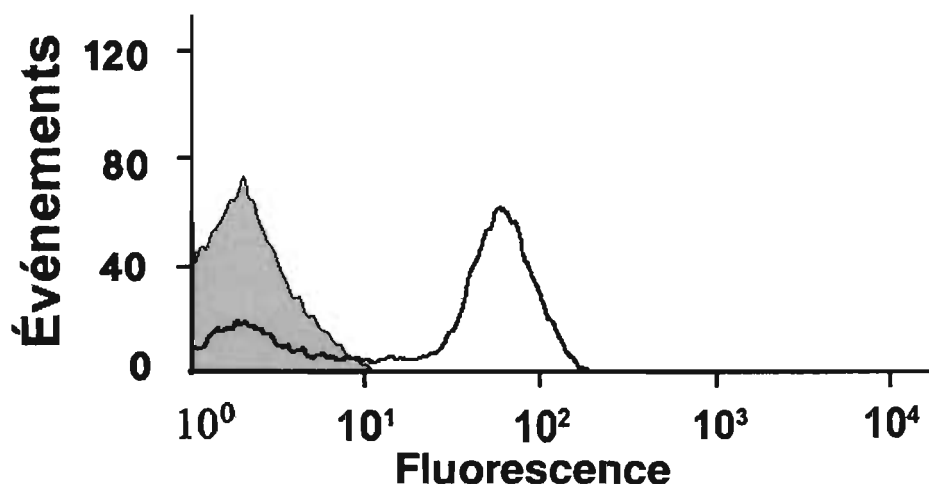


Figure 3.3 Niveau d'expression de lip35 à partir de la construction pBudp35kokak.

Les cellules ont été transfectées de façon transitoire avec soit 2 ug de plasmide pBud vide (en gris) ou 2ug de pBud-lip35kozak. Après 48h, elles ont été fixées et perméabilisées. Le marquage intracellulaire a été fait avec l'anticorps Bu45 reconnaissant la partie C-terminale de li et l'anticorps Alexa GAM-488 a servi d'anticorps secondaire.

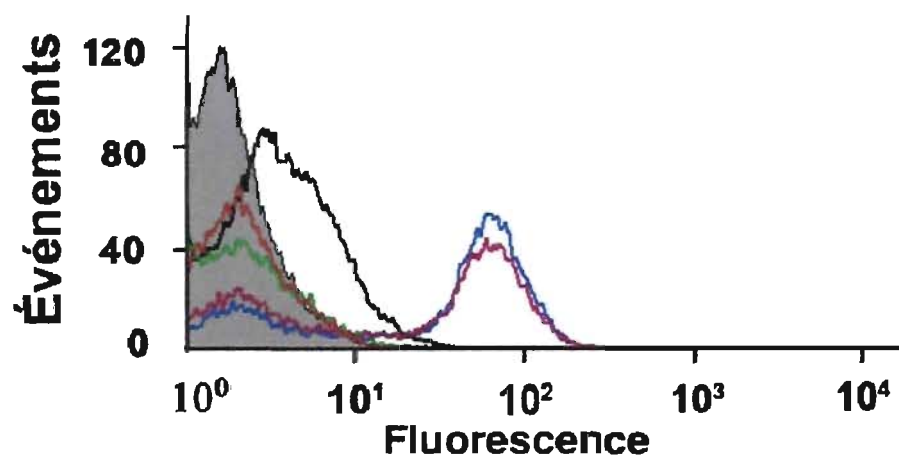


Figure 3.4 : Niveau d'expression de li à partir de pDOI-6.

Marquage intracellulaire de cellules 293T transfectées avec les plasmides pDOI-6 (en gris), pDOI-6 avec CIITA (en noir), pDOI-6p33 (en vert), pDOI-6p33 avec CIITA (en mauve) et pDOI-6p35 (rouge) et pDOI-6p35 avec CIITA (en bleu). Après 48 heures, les cellules ont été fixées et perméabilisées. Les anticorps BU45 et Alexa GAM-488 ont été utilisés pour le marquage.

Après séquençage des clones pDOI-6p33 et p35, il était important de déterminer l'efficacité de leur expression. L'expression de l'ADNc étant sous le contrôle du promoteur du gène *Ii*, il est nécessaire de co-transfecter le transactivateur CIITA pour activer la transcription. Ceci assurera l'expression spécifique de *Ii* uniquement dans les cellules présentatrices. Des cellules 293T ont été transfectées au $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ avec deux μg d'ADN de ces constructions avec ou sans le transactivateur CIITA. Après 48 heures, un marquage intracellulaire indirect a été fait avec les anticorps BU45 et GAM-488. Les cellules qui ont été transfectées avec le plasmide vide pDOI-6 démontrent la fluorescence de base. L'expression génomique basale de *Ii* endogène a été déterminée par la transfection du transactivateur CIITA cotransfecté avec le plasmide vide.

D'autres témoins ont été faits pour s'assurer de l'expression des constructions seulement en présence de CIITA. En guise de témoins, les plasmides pDOI-6p33 et p35 ont aussi été transfectés seuls (Figure 3.4). Il est important pour l'établissement des lignées de souris transgéniques que l'expression de *Ii* soit unique aux cellules cibles. C'est-à-dire les cellules présentatrices d'antigènes : les seules exprimant le transactivateur CIITA. Le témoin pDOI-6 + CIITA est très important puisqu'il nous informe sur le niveau d'expression de *Ii* endogène. On peut constater dans la figure 3.4, la différence marquante d'expression de *Ii* entre les constructions et le plasmide vide cotransfectées avec CIITA. Les résultats obtenus démontrent donc un faible niveau d'expression de *Ii* endogène comparativement à l'expression de *Ii* provenant de l'ADNc. De plus, les constructions transfectées sans CIITA n'ont pas exprimé *Ii*. Nous pouvons donc affirmer que nos constructions pDOI-6p33 et p35 expriment de façon spécifique en fonction de l'expression de CIITA.

3.1.3 Établissement des lignées de souris transgéniques et criblage de l'expression de *Ii*

Après avoir confirmé que les clones moléculaires permettaient l'expression de *Ii*, ceux-ci devaient être préparés pour permettre la microinjection dans les ovocytes de souris. Les plasmides ont d'abord été digérés par les enzymes *XhoI* et *PvuI* (Figure 3.1 B) et les fragments de 7500pb (contenant le promoteur murin, *Ii* et le signal de polyadénylation)

ont été isolés sur gel et sur colonne ELUTIP-D afin d'éliminer les sels et les impuretés qui seraient présents dans la solution d'ADN.

Une fois injectés, les ovocytes ont été implantés dans une souris pseudo-gestante de souche FVB. Quatre semaines après la naissance des souriceaux, un bout de queue a été coupé pour permettre de vérifier l'intégration du transgène. Le criblage peut se faire par différentes techniques. La technique de Southern blot permet de voir le nombre de sites d'insertion du transgène ainsi que le nombre de copies. Cette technique consiste à hybrider spécifiquement une sonde avec l'ADN génomique digéré en fragments. La figure 3.6 montre le criblage obtenu après la première portée de souris transgéniques *Iip35*. L'ADN génomique a préalablement été digéré avec l'enzyme *BamHI* (Figure 3.5). La sonde a été produite en excisant un fragment *BamHI* du plasmide pDOI-6p35. L'ADNc de *Ii* a été inséré entre deux sites de restrictions *BamHI* (Figure 3.2). Le fragment d'ADN obtenu comprend le premier AUG de départ et le codon STOP de *Ii*. La sonde s'hybride donc complètement au *Ii* humain situé dans le génome murin. Cette sonde de 1Kb permet une association spécifique au gène humain. L'intensité de la bande obtenue nous informe sur le nombre de sites d'insertion. En effet, plus il y a de sites contenant le transgène, plus la bande aura une forte intensité.

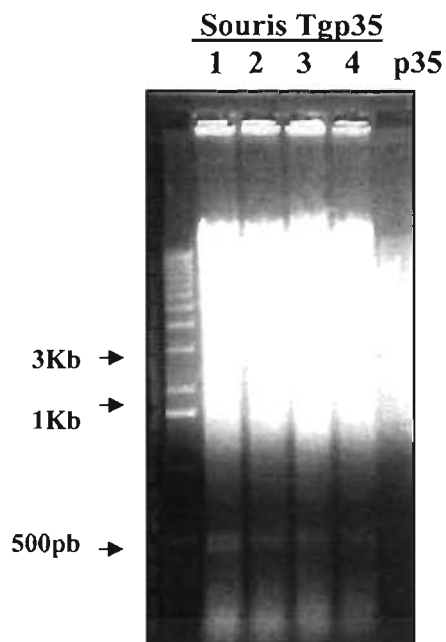


Figure 3.5 : Digestion *BamHI* de l'ADN génomique des souris transgéniques *Iip35*

La première portée comptait quatre souriceaux. Seulement la souris numéro quatre avait intégré le transgène. (Figure 3.6). Cependant, puisqu'il n'y a qu'une bande pour tous les puits, nous ne pouvons pas nous référer à un témoin et ainsi connaître le nombre de sites d'insertion selon l'intensité de la bande. Malgré l'absence de bande, le plasmide pDOI-6p35 servait de contrôle positif. Une mauvaise dilution ou la dégradation du plasmide pDOI-6p35 expliquerait le résultat négatif obtenu lors de cette dernière expérience (Figure 3.6). Cette expérience a été faite qu'une seule fois en Southern puisque nous avons opté pour la méthode de criblage par PCR.

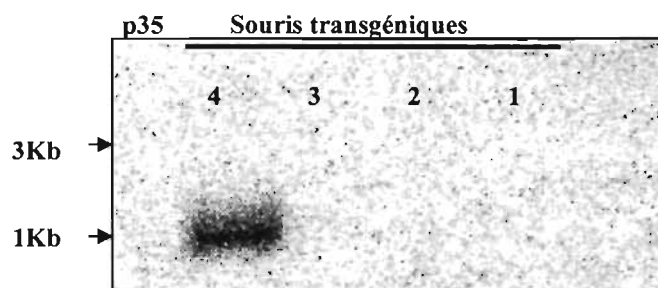


Figure 3.6 : Criblage des souris transgéniques p35 par Southern blot.

Le Southern blot a été réalisé à l'aide de l'ADN génomique des quatre souriceaux de la première portée de lip35 transgénique. La sonde, marquée au ^{32}P , correspondait à la séquence de nucléotides du gène de Ii provenant du plasmide pDOI-6p35 cloné précédemment. Le plasmide pDOI-6p35 servait de contrôle positif pour l'expérience (premier puit) et le dernier puit correspondait au marqueur de poids moléculaires.

D'autres injections ont été faites pour l'obtention de trois souris transgénique lip33 et cinq souris lip35 (Figure 3.7). Le schéma représente les portées de souris obtenues suite aux injections. Plusieurs injections ont été nécessaires pour générer plusieurs souris de chaque transgène.

Afin de cribler rapidement les portées subséquentes, nous avons poursuivi avec la méthode de PCR. Cette méthode, à l'aide d'amorce spécifique pour le transgène, amplifie la région correspondant soit à lip33 ou lip35. Le fragment amplifié correspond à l'ADNc du gène de Ii, soit d'environ 700pb (Figure 3.9 et 3.8 respectivement). Cette technique est rapide et permet d'identifier rapidement les souris possédant le transgène. Sur les trois portées obtenues pour les souris transgéniques lip35 (Figure 3.7 A et 3.8), cinq souris se sont avérées positives par cette technique.

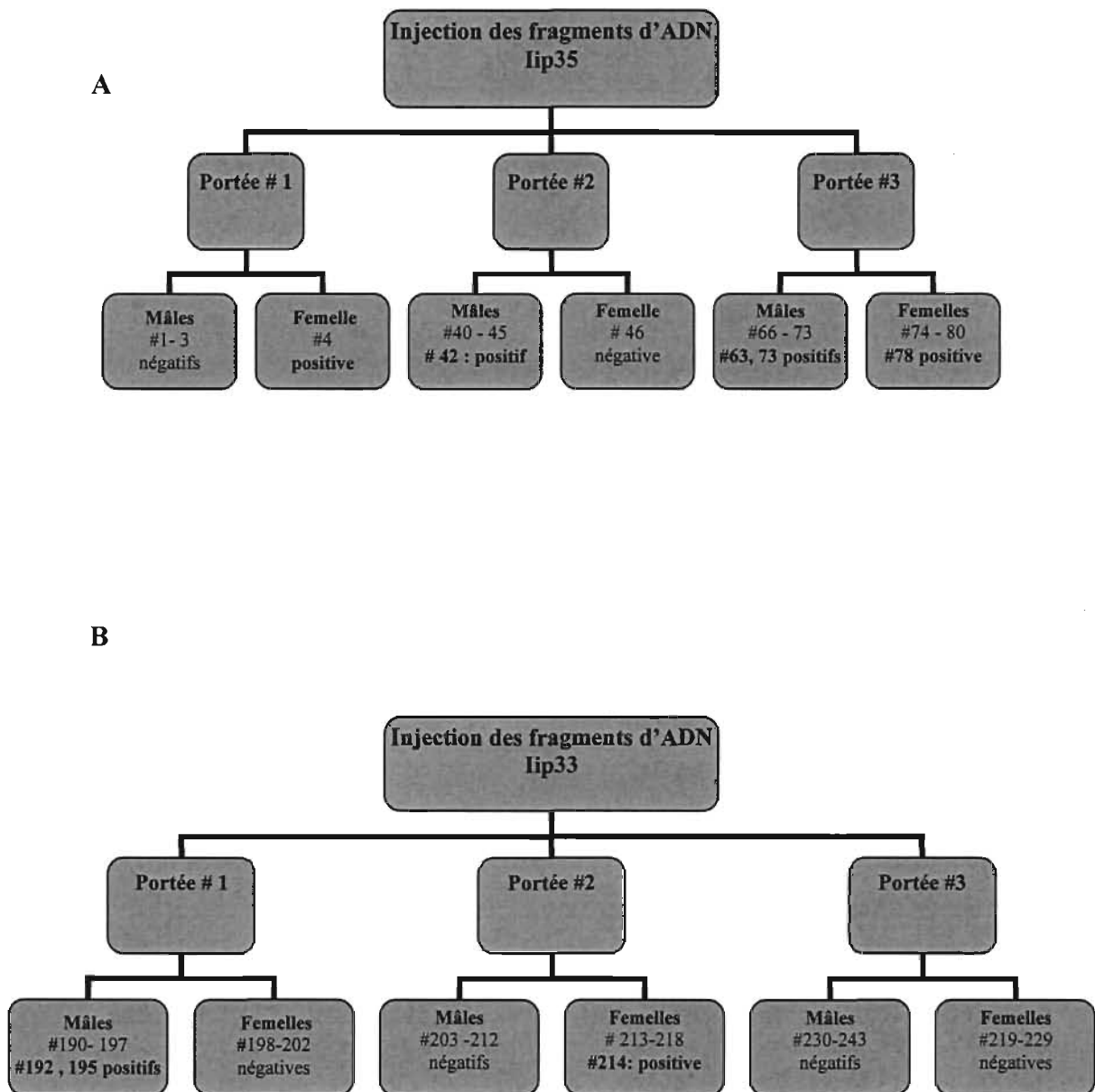


Figure 3.7 : Organigrammes illustrant les souris transgéniques obtenues.

A) Schématisation des différentes portées de souris obtenues suite à l'injection du fragment p35. Au total, cinq souris, deux femelles et trois mâles, possédant le transgène, ont été détectées. B) Schématisation des différentes portées de souris obtenues suite à l'injection du fragment p33. Au total, trois souris, une femelle et deux mâles, possédant le transgène ont été détectées.

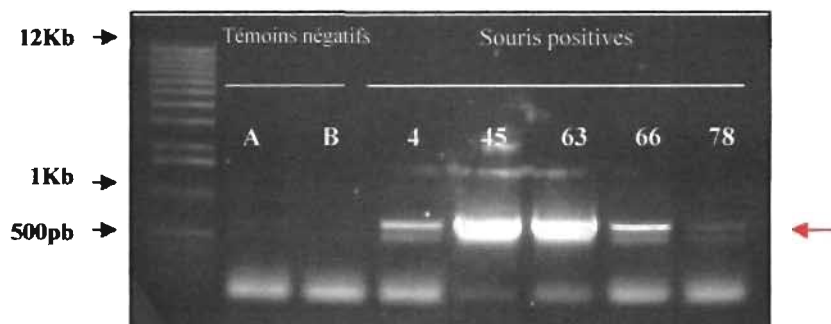


Figure 3.8 : Criblage des souris transgéniques lip35 par PCR.

Les PCR ont été réalisés à l'aide d'amorces correspondant à la séquence de li situées en amont et en aval du gène. Chacun des oligos est spécifique pour une partie du vecteur pDOI-6 et une partie de li. L'amplification de li montre que le gène a été inséré dans le génome des souris. Les puits A et B correspondent aux témoins négatifs. A est un témoin sans ADN et B correspond l'amplification d'un échantillon d'ADN génomique de souris non-transgéniques. La flèche rouge montre les fragments de 700pb correspondant à la chaîne invariante p35. La souris numéro 4 a servi de témoin positif puisqu'elle s'était avérée positive par Southern blot (Fig.3.5)

La même stratégie de criblage a été suivie pour les souris transgéniques lip33. La figure 3.8 montre les trois souris transgéniques lip33 positives. Tout comme pour les souris lip35, il a fallut trois portées pour obtenir un nombre suffisant souris transgéniques lip33 (figure 3.7B).

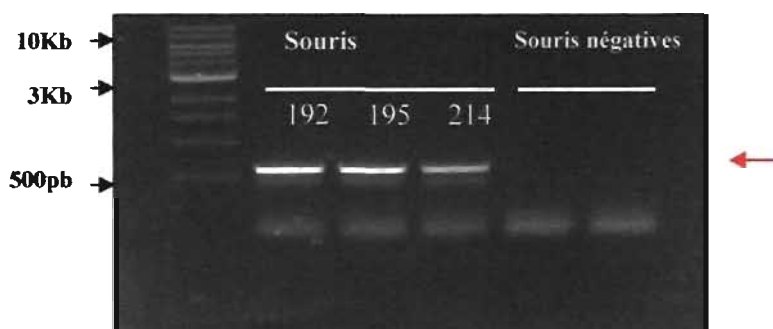


Figure 3.9 : Criblage des souris transgéniques lip33 par PCR.

Les PCR ont été réalisés comme pour la figure 3.8. La flèche rouge montre les fragments de 700pb correspondant à la chaîne invariante p33. Les souris négatives servent de témoin et correspondent aux souris # 222 et 224 préalablement testées.

3.1.4 Niveaux d'expression de la chaîne invariante humaine chez les souris transgéniques

Après avoir identifié les souris positives, il était important d'évaluer le niveau d'expression de Ii au niveau cellulaire. En effet, la présence du transgène dans le génome murin n'assure pas l'expression de celui-ci. Un échantillon de sang a été prélevé et les lymphocytes perméabilisés ont été marqués avec l'anticorps BU45 pour connaître le niveau d'expression intracellulaire de Ii. Cet anticorps se lie à la région C-terminale de la chaîne Ii humaine mais ne reconnaît pas l'homologue murin. Les cellules ont aussi été marquées en surface avec l'anticorps anti-B-220 (couplé au FITC). Ce dernier est spécifique au marqueur CD45, permettant ainsi d'isoler la population de lymphocytes B. La figure 3.10 montre les résultats de cytométrie en flux obtenus chez les différentes souris transgéniques Iip35. La population cellulaire identifiée en rouge (quadrant en haut à droite) correspond aux cellules positives pour les deux marqueurs. Les lymphocytes B n'expriment pas tous Iip35 et le niveau d'expression de Iip35 est très variable d'une souris à l'autre. Alors, que 27 % et 18 % des cellules B expriment Iip35 chez les souris 4 et 45 respectivement, l'expression la plus élevée que nous avons obtenue correspond à 38 % des cellules B chez la souris 63. Les souris 66 et 78 ont un niveau très faible d'expression, soit 1 et 5 % respectivement.

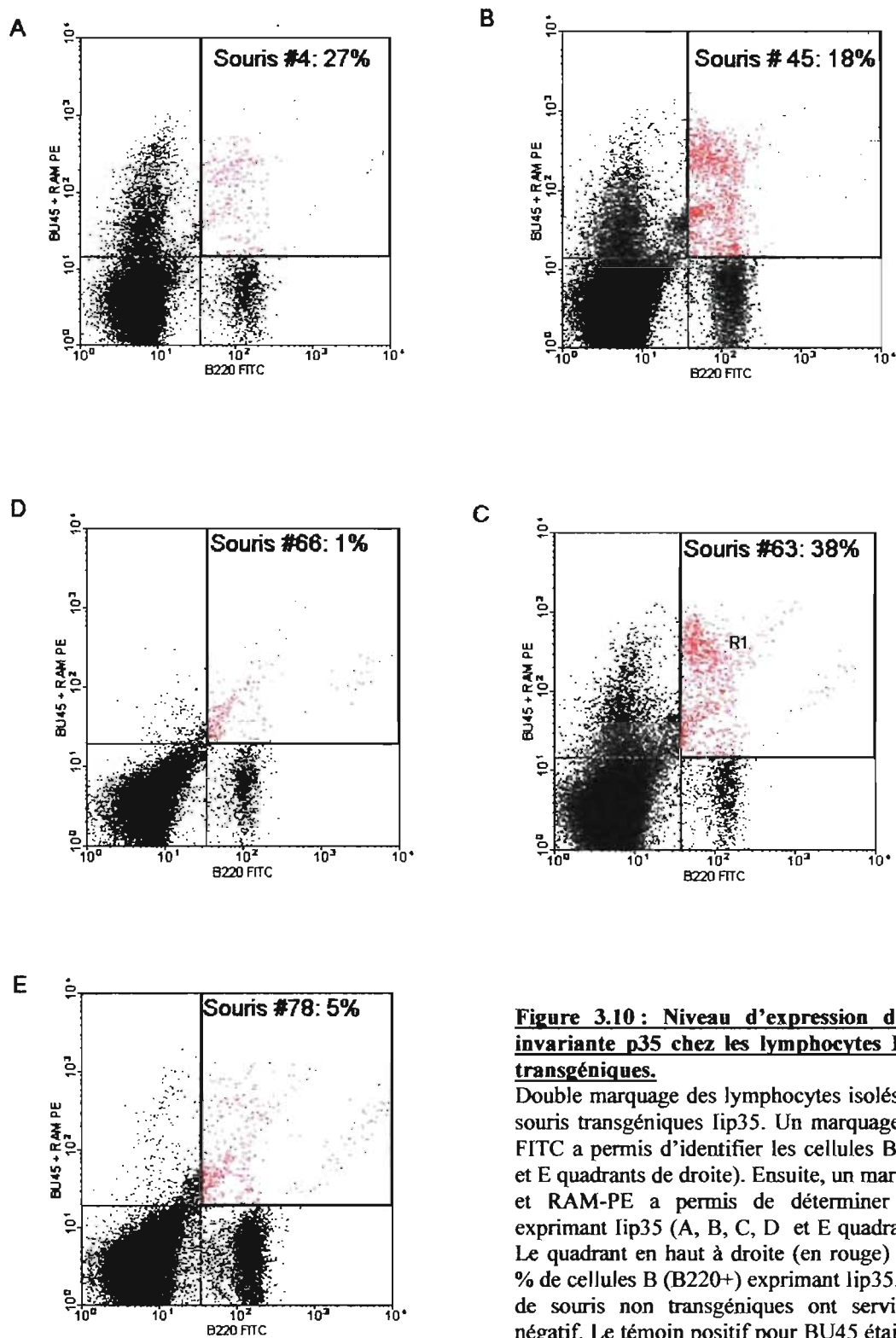


Figure 3.10 : Niveau d'expression de la chaîne invariante p35 chez les lymphocytes B des souris transgéniques.

Double marquage des lymphocytes isolés du sang des souris transgéniques lip35. Un marquage anti B-220-FITC a permis d'identifier les cellules B (A, B, C, D et E quadrants de droite). Ensuite, un marquage BU45 et RAM-PE a permis de déterminer les cellules exprimant lip35 (A, B, C, D et E quadrants du haut). Le quadrant en haut à droite (en rouge) représente le % de cellules B (B220+) exprimant lip35. Des cellules de souris non transgéniques ont servi de témoin négatif. Le témoin positif pour BU45 était des cellules exprimant DR1lip35.

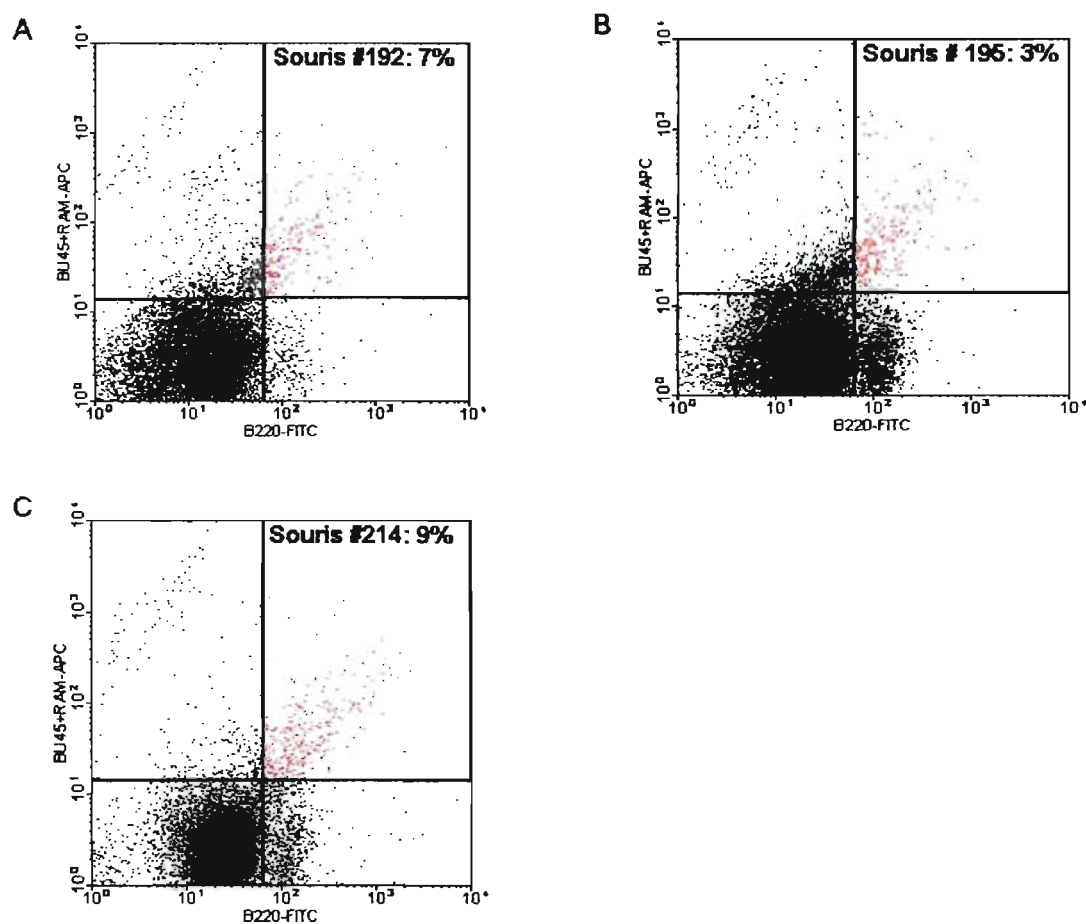


Figure 3.11 : Niveau d'expression de la chaîne invariante p33 chez les lymphocytes B des souris transgéniques.

Double marquage des lymphocytes isolés du sang des souris transgéniques lip33. Un marquage anti B-220-FITC a permis d'identifier les cellules B (A, B et C quadrants de droite). Ensuite, un marquage BU45 et RAM-PE permet de déterminer les cellules exprimant lip33 (A, B et C quadrants du haut). Le quadrant en haut à droite (en rouge) représente le % de cellules B (B220+) exprimant lip33. Des cellules de souris non transgéniques ont servi de témoin négatif. Le témoin positif pour BU45 était des cellules exprimant DR1lip35.

Les trois souris transgéniques lip33 ont été analysées de la même façon que les lip35. Le nombre de lymphocytes B positifs pour le transgène lip33 est cependant plus faible. Le taux le plus élevé retrouvé chez la souris 214 correspond à 9 % des cellules B exprimant lip33. Les souris 192 et 195 montrent respectivement 7 % et 3 % de leurs lymphocytes B

exprimant Iip33 (Figure 3.11). Pour chacun des transgènes p33 et p35, les lymphocytes B qui sont positifs possèdent un taux d'expression cellulaire élevé. L'établissement de souris transgénique est une technique délicate qui ne réussit pas toujours au premier essai. De plus, la présence du transgène ne garantit pas son expression. D'autres tests devront être effectués sur les souris transgéniques obtenues. Par exemple, des digestions avec plusieurs enzymes de restrictions pourraient nous informer d'avantage sur le nombre de sites d'insertion du transgène. De plus, la population cellulaire des organes lymphatiques devra être caractérisée sur les générations suivantes. Les marquages effectués sur le sang prélevé des souris transgéniques n'étaient pas idéaux car seulement une faible quantité de cellules peuvent être isolées. Cependant, une fois bien caractérisé, ce modèle sera très utile pour des études ultérieures.

3.2. Production d'un anticorps polyclonal anti-p35

Les anticorps existant pour la reconnaissance de la chaîne invariante humaine sont limités. Très peu sont disponibles sur le marché. Ils ne discriminent pas les différents isotypes en cytométrie et en microscopie à fluorescence. Aussi, on ne peut pas différencier les niveaux d'expression de Iip33 et de Iip35 pour une même cellule à moins de procéder à des analyses de type Western blot. Les anticorps reconnaissent soit la région N-terminale (PIN-1) ou C-terminale (BU45) commune à toutes les isoformes de la protéine. La production d'un anticorps spécifique à la queue cytoplasmique de Iip35 permettrait de réaliser des études plus approfondies sur cette isoforme. Par exemple, suivre le trajet cellulaire de Iip35 qui semble différent de Iip33. Il pourrait servir lors d'immunoprécipitation pour connaître son association avec les molécules de classe II. En plus, puisque l'anticorps est spécifique pour la queue cytoplasmique de Iip35, on pourrait suivre sa dégradation et connaître davantage son rôle dans la signalisation cellulaire.

3.2.1 Production d'anticorps polyclonaux anti-lip35

La production d'anticorps anti-lip35 a débuté par l'injection d'un peptide synthétique correspondant aux 16 acides aminés spécifiques à la queue cytoplasmique. L'injection chez deux lapins du peptide libre en présence de l'adjuvant Titermax (Sigma, USA) n'a pas réussi à monter une réponse efficace. Ces lapins ont subi la même série d'immunisations qui est illustrée à la figure 3.12 concernant l'injection du peptide couplé. Cependant, après 42 jours aucune production d'anticorps n'a été détectée par ELISA (données non illustrées). Les ELISA ont été réalisés comme décrit précédemment dans la section procédures expérimentales. C'est à dire que le peptide a été adsorbé au fond d'une plaque de 96 puits et ensuite, le sérum provenant de chaque prélèvement a servi pour la détection du peptide. Dans le but d'augmenter l'immunogénicité du peptide, nous avons couplé le peptide à la protéine KLH. Cette protéine est souvent utilisée lors de couplage avec des peptides lors d'immunisation. Nous l'avons choisi préférentiellement à l'ABS (albumine, bovine serum) pour éviter les réactions croisées lors d'expériences ultérieures. Le complexe fut injecté avec l'adjuvant complet de Freund à deux lapins. Des prélèvements sanguins ont été faits sur une base hebdomadaire pour suivre la production d'anticorps (7, 14 et 21 jours). Un rappel a été effectué au jour 21 et deux prélèvements ont suivi (jour 28 et jour 35). Un dernier rappel a été fait et le sérum a été récolté par ponction cardiaque la semaine suivante (Figure 3.12). Les doses de rappels étaient constituées de 0,6 mg du complexe peptide-KLH et de l'adjuvant de Freund incomplet (selon recommandation de la compagnie) dans un volume final de 0.6 ml.

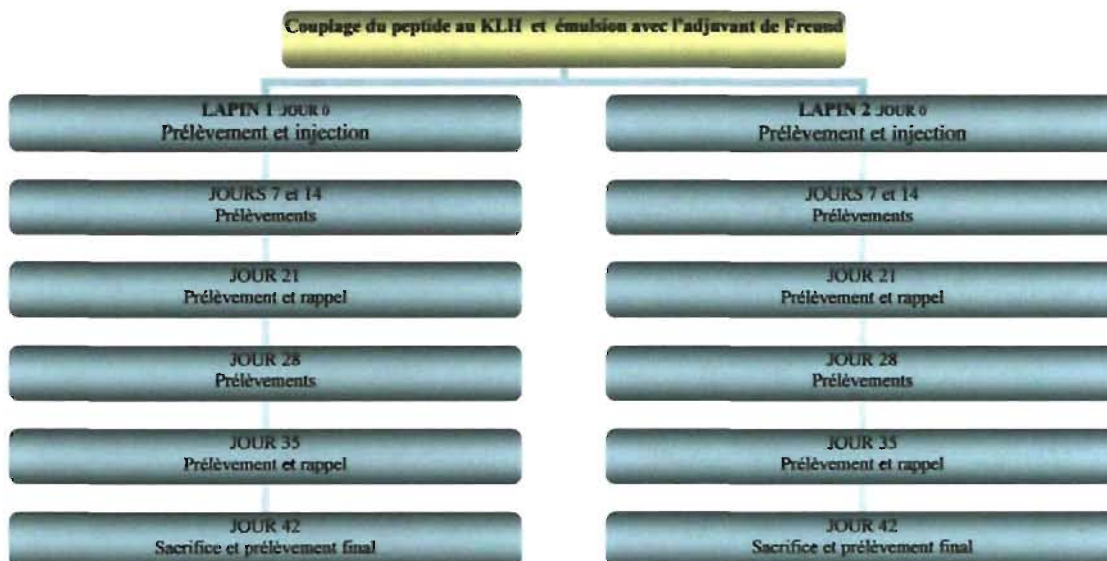


Figure 3.12 : Schématisation de l'immunisation des lapins.

Illustration du calendrier d'immunisation pour chacun des lapins

L'efficacité de la production d'anticorps a été évaluée par ELISA pour chacun des lapins immunisés (lapin 1 : figure 3.13 et lapin 2 : figure 3.14). De plus, afin d'évaluer l'efficacité de l'immunisation, la protéine KLH a été liée de la même façon au fond de puits distincts et a été utilisé comme contrôle. La figure 3.13 montre l'augmentation de la production d'anticorps chez le lapin 1 en fonction du nombre d'injections et du temps. Une forte augmentation du titre des anticorps a été observée au jour 14 suivant la première injection. Par la suite, d'autres injections ont permis d'augmenter considérablement le titre (Figure 3.13). Le lapin 1 démontre donc une réponse croissante autant pour le peptide p35 que pour la protéine KLH.

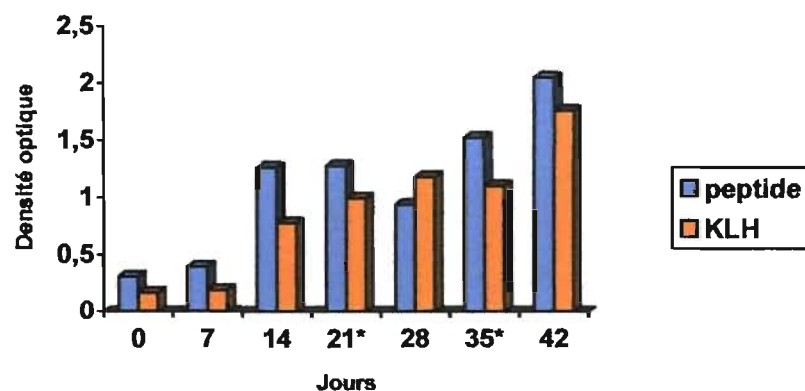


Figure 3.13 : Détection de la production d'anticorps sériques par le lapin 1.

Production d'anticorps anti-p35 (en bleu) et anti-KLH (en orange). Le temps 0 correspond au sérum préimmun récolté avant la première injection. Les rappels aux jours 21 et 35 sont indiqués (*).

L'immunisation du lapin 2 a suivi le même protocole d'injections et de prélèvements que le lapin 1 (Figure 3.12). La récolte de sang fut très difficile chez ce lapin et le prélèvement du jour 21 fut un échec. Cependant, la production d'anticorps a augmenté avec le temps et le nombre d'immunisation. Une nette augmentation du titre a été observée au jour 14 (Figure 3.14). Une DO optimale d'environ 2.2 a été obtenue par le lapin 1. La production d'anticorps obtenu par le lapin 2 (DO 1.4) est légèrement plus faible que chez le lapin 1 (DO 2.2) (Figure 3.13 et Figure 3.14). Les sérums obtenus au jour 35 furent par la suite titrés et un fort signal a été observé à une dilution aussi faible que 1:1000 (Figure 3.15).

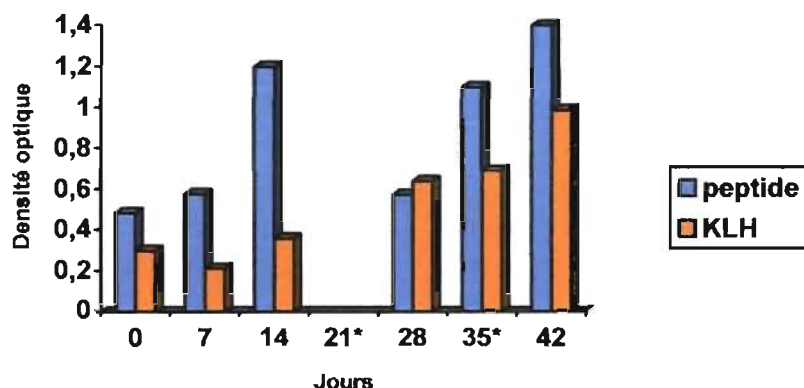


Figure 3.14 : Détection de la production d'anticorps sériques par le lapin 2.

Production d'anticorps anti-p35 (en bleu) et anti-KLH (en orange). Le temps 0 correspond au sérum préimmun récolté avant la première injection. Les *voir plus haut aux jours 21 et 35 indiquent les moments où le lapin a reçu un rappel. Il n'y a pas de résultats pour le jour 21 puisque le prélèvement fut un échec.

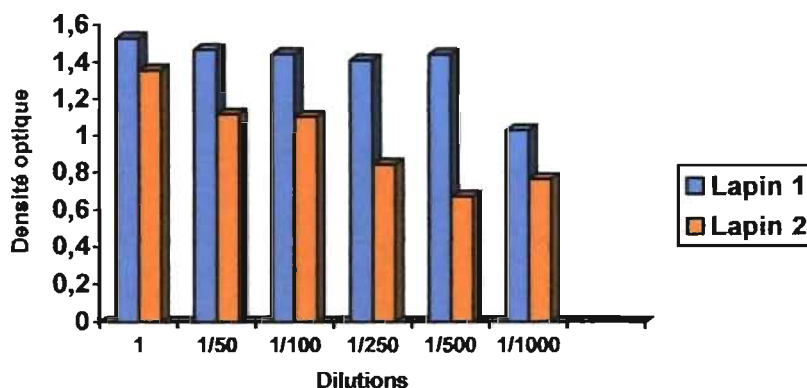


Figure 3.15 : Titrage des anticorps anti-p35 produits par les lapins 1 et 2.

Les sérums utilisés pour le titrage des anticorps sont ceux obtenus 35 jours après l'immunisation. Plusieurs dilutions des sérums du lapin 1 (en bleu) et du lapin 2 (en orange) ont été effectuées en série.

3.2.2 Caractérisation des anticorps anti-lip35

Par la suite, les sérums anti-p35 des lapins 1 et 2 ont été testés pour leur capacité à détecter la forme cellulaire de la chaîne invariante lip35. Des cellules 293T transfectées exprimant lip35 de façon stable ont été marquées à l'aide des sérums des lapins 1 et 2. Différentes dilutions ont été testées pour chaque sérum (1:10, 1:25, 1:50, 1:100 et 1:500)

et un anticorps secondaire de chèvre couplé au fluorochrome Alexa-633 a été utilisé. Les cellules ont été analysées en cytométrie en flux. Contrairement aux résultats obtenus avec l'anticorps PIN-1, aucun signal n'a été détecté avec les sérums polyclonaux de lapin (Figure 3.16). Ce marquage intracellulaire a été fait à plusieurs reprises et chaque fois le même résultat a été obtenu : ces résultats suggèrent que l'extension de 16 acides aminés de la forme lip35 adoptent une structure secondaire ou tertiaire dans le contexte de la protéine entière et que cette structure est différente de celle adoptée par le peptide synthétique.

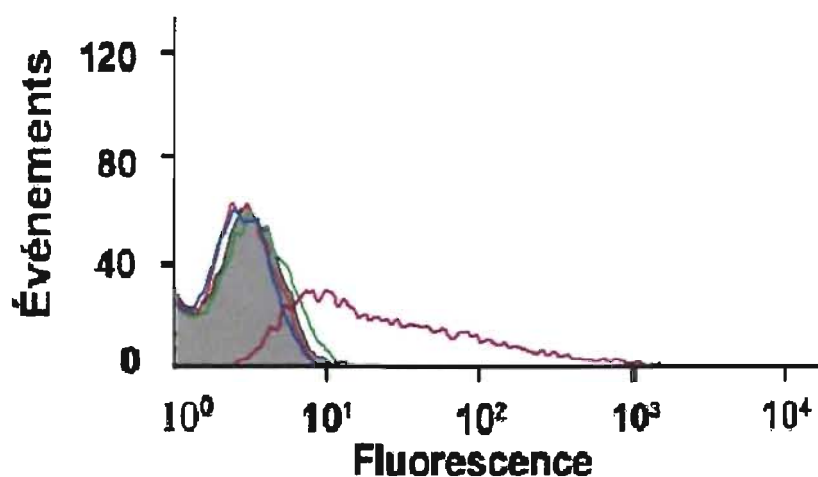


Figure 3.16 : Marquage intracellulaire de cellules 293TDR1p35 avec le sérum d'anticorps polyclonaux du lapin 1.

Des cellules 293TDR1p35 stables ont été marquées par différentes dilutions du sérum polyclonal. Les dilutions 1/50 (en vert), 1/100 (en rouge) et 1/500 (en bleu) des sérums servaient d'anticorps primaires. En mauve l'anticorps PIN-1 a servi de contrôle positif. L'anticorps secondaire utilisé était GAR-633.

Les anticorps ont ensuite été testés pour leur capacité à reconnaître la protéine dénaturée sur gel SDS-PAGE. Des lysats cellulaires ont été préparés à partir des cellules 293T transfectées de façon stable avec lip35 et la molécule DR1. Les échantillons de protéines ont été séparés sur gel SDS-PAGE. Après la séparation des protéines et le transfert de type Western blot, une dilution des sérums 1:500 a été utilisée pour la détection de lip35 (Figure 3.17). Les sérums pré-immuns ont été utilisés comme contrôles négatifs et ceux-ci n'ont pas réagi contre les lysats. De la même façon, aucun signal n'a été détecté avec les anticorps anti-lip35 sur les lysats de cellules 293T ayant servi de témoins négatifs.

L'anticorps monoclonal PIN-1 a servi de contrôle positif et a montré la présence d'une bande majeure migrant à une taille de 35 kDa. Cet anticorps est spécifique à li humain mais reconnaît la région N-terminale de tous les isoformes. Une bande légèrement plus lourde est également reconnue par l'anticorps et pourrait représenter la forme phosphorylée de lip35 (69). Comme prévu, il n'y pas eu de détection de li dans les lysats cellulaires de 293T.

Les sérums des lapins 1 et 2 ont, par la suite, servi pour la détection. Nous remarquons la présence d'une bande spécifique à lip35 avec le sérum du lapin 1 (Figure 3.17). Par contre, un bruit de fond important a été observé lors de l'utilisation de ces sérums. Plusieurs bandes sont visibles indiquant que la spécificité de l'anticorps polyclonal n'est pas optimale. Le sérum est un mélange hétérogène de protéines et certaines peuvent se fixer non spécifiquement à la membrane ou à d'autres protéines. Le sérum provenant du lapin 2 a montré une faible réactivité envers lip35 et nous avons donc décidé de poursuivre nos études avec le sérum du lapin 1.

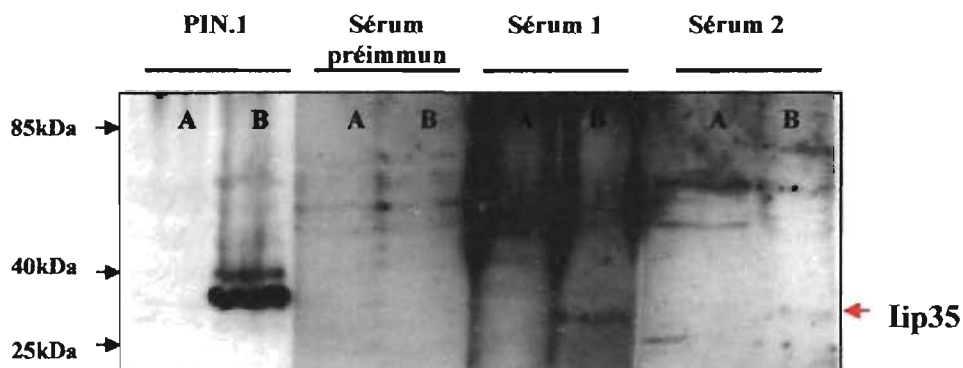


Figure 3.17 : Détection par immunobuvardage de la liaison des anticorps polyclonaux avec lip35.

Des lysats cellulaires ont été séparés par SDS-PAGE 12%. Les puits A correspondent à des lysats de cellules 293T servant de témoin négatif pour chaque anticorps et sérums utilisés. Les puits B correspondent aux lysats de cellules 293TDR1lip35. Le sérum préimmun provient du sang du lapin 1 prélevé avant la première immunisation. La flèche rouge indique les bandes à 35 kDa correspondant à lip35. Tous les sérums ont été dilués 1 :500 dans une solution de lait à 5%.

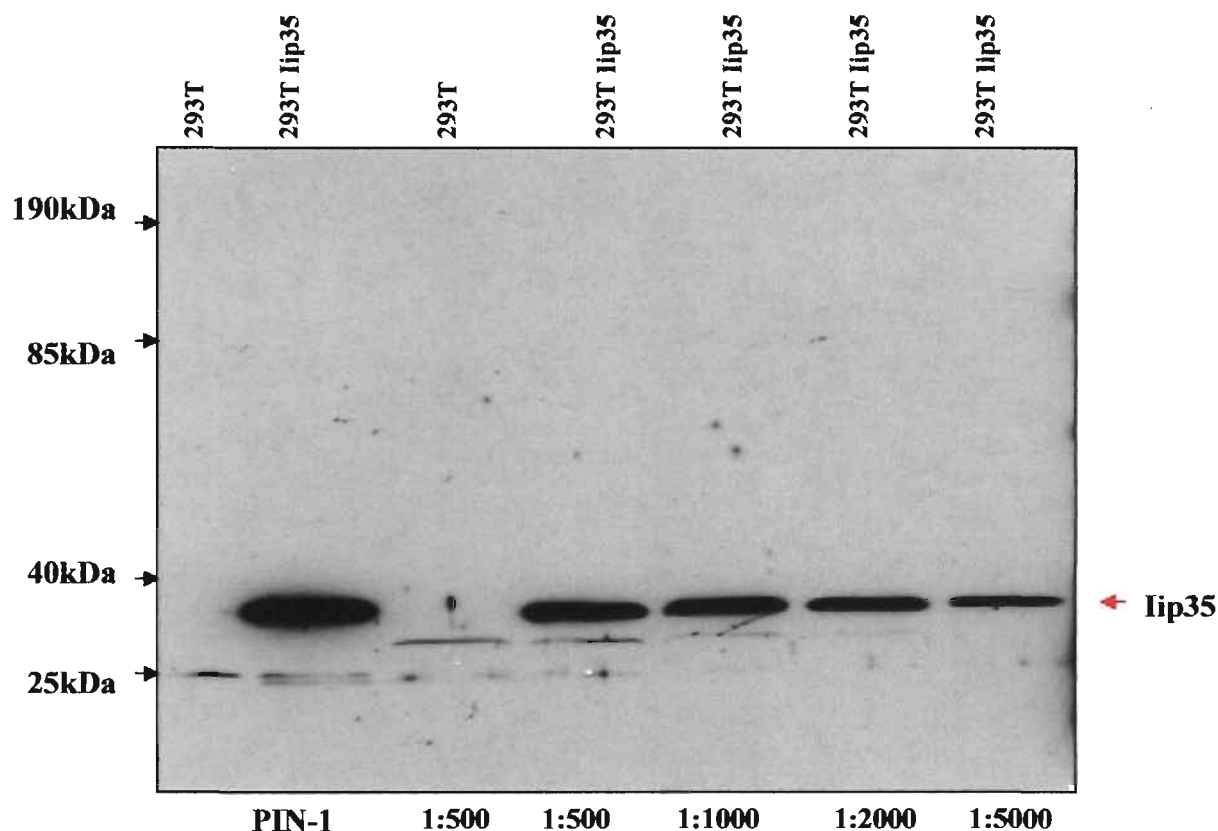


Figure 3.18 : Détermination par immunobuvardage de la spécificité de l'anticorps polyclonal anti-Iip35 après purification sur colonne de sépharose.

Après avoir purifié l'anticorps sur une colonne CNBR sépharose 4B, un immunobuvardage a été fait pour tester sa spécificité. Des lysats de cellules 293T ont servi de témoin négatif et l'utilisation de PIN-1 servait de témoin positif. La flèche rouge indique les bandes à 35 KDa correspondant à Iip35. Le sérum purifié provenait du lapin 1 et a été dilué 1:500, 1:1000, 1:2000 et 1:5000.

Afin de réduire le bruit de fond associé au sérum du lapin 1, nous avons procédé à un nouveau prélèvement et à une purification des anticorps spécifiques sur une colonne de sépharose couplée au peptide synthétique p35 ayant servi à l'immunisation. Le sérum a d'abord été déposé sur une colonne de sépharose non-couplée afin d'éliminer les composants pouvant s'adsorber non spécifiquement à la résine. Une deuxième colonne de purification avec la résine sépharose 4B CNBr couplée au peptide a été montée et le sérum a été passé par gravité à deux reprises. Après plusieurs lavages, les anticorps spécifiques ont été élués et les fractions correspondant au pic protéique ont été conservées. Après dialyse un immunobuvardage a été réalisé comme précédemment (Figures 3.17 et 3.18). Nos résultats démontrent que l'anticorps polyclonal purifié est

spécifique à en juger par le signal intense obtenu au poids moléculaire de 35KDa pour une dilution de 1:5000 et par l'absence de bandes contaminantes

Chapitre 4: Discussion

La présentation antigénique est la clé de la réponse immunitaire et de la discrimination du soi et du non-soi. En plus de permettre leur activation par la présentation de peptides antigéniques, les molécules de classe II du CHM participent à la sélection du répertoire des cellules T CD4⁺. Au plan moléculaire, les rôles de Ii sont multiples. D'abord, lors de l'assemblage des chaînes α et β du CHM de classe II dans le RE, Ii assure la formation d'un complexe nonamérique stable. La région nommée CLIP protège la niche peptidique des molécules de classe II du CHM, empêchant ainsi la liaison de peptides endogènes. Ii joue un rôle de chaperon puisqu'elle guide le complexe nonamérique vers les endosomes. C'est dans ces compartiments qu'il y a échange du CLIP pour un peptide antigénique « exogène » destiné à être présenté à la surface cellulaire.

Chez l'humain, différentes isoformes de Ii sont présentes. Iip35 est un pion important de la présentation antigénique. Cette forme possède une queue cytoplasmique plus longue de 16 acides aminés comparativement à Iip33, ce qui confère à Iip35 un rôle différent. Le motif de rétention RXR présent dans l'extension de sa queue cytoplasmique permettrait une maturation plus efficace des molécules de CHM de classe II (61,103). Cependant, cette hypothèse reste à démontrer et le rôle de Iip35 demeure toujours nébuleux. Des études récentes suggèrent que des variations du niveau d'expression de Iip35 pourraient avoir un impact dans le développement de maladies auto-immunes telle que le diabète de type 1 ou encore dans le développement de certaines leucémies (104,105).

C'est dans cette optique que nous avons cherché à développer des outils permettant de mieux caractériser la fonction de Iip35. Tout d'abord, la génération d'une lignée de souris transgéniques exprimant Iip35 permettra d'étudier l'impact du niveau d'expression de Iip35 sur la sélection du répertoire peptidique menant ou non vers le développement de maladies auto-immunes. Ensuite, la production d'un anticorps polyclonal spécifique à cette isoforme sera d'une grande utilité pour détecter Iip35 lors de l'exécution de différentes techniques expérimentales telle que la caractérisation de la lignée de souris transgéniques produite.

4.1 Établissement de lignées de souris transgéniques

L'utilisation de souris transgéniques constitue un outil de recherche précieux puisqu'il permet d'étudier dans un système complexe les principaux facteurs étiologiques de certaines pathologies. Plusieurs modèles de souris transgéniques ont, à ce jour, amélioré la compréhension et permis la détermination des prédispositions génétiques favorisant le développement des maladies auto-immunes.

Sachant que certains allèles de HLA confèrent une prédisposition pour le développement de maladies auto-immunes, des groupes ont dérivé génétiquement des souris afin de les « humanisées » en exprimant des molécules du locus HLA. De telles souris transgéniques exprimant par exemple HLA-DR et HLA-DQ ont permis de déterminer l'influence allélique sur le répertoire peptidique présenté aux cellules T et sur le développement de cellules T autoréactives. Les études utilisant des souris transgéniques ont débuté avec l'expression d'une seule chaîne des molécules de classe II du CMH, ce qui a démontré que les chaînes humaines pouvaient s'associer avec les chaînes murines (106). Par la suite, d'autres souris transgéniques ont été faites avec des molécules complètes du HLA. Des modèles de souris transgéniques exprimant soit HLA-DQ4 ou HLA-DQ8 ont confirmé le rôle de HLA-DQ8 dans le développement du diabète de type 1. Ces modèles ont en plus démontré que même certains allèles pouvaient avoir un effet protecteur contre l'apparition de cette maladie (107,108). La production de plusieurs souris transgéniques a donc permis de mieux comprendre et cibler les prédispositions génétiques menant vers le développement de maladies auto-immunes.

De plus, l'établissement de lignées de souris « knock out » Ii^{-/-} a apporté plusieurs réponses sur les fonctions de cette protéine dans la présentation antigénique. Plusieurs groupes ont caractérisé le phénotype spécifique associé à ces souris. L'absence de Ii a confirmé l'importance de ce chaperon au cours de la présentation antigénique. Chez la souris, seules les isoformes Iip31 et p41 sont exprimées, où Iip31 est l'homologue de Iip33 humain (39,40,109,110). La production de souris transgénique pour Iip33 humain a déjà été réalisée. Ce modèle a permis de caractériser l'influence de

l'affinité du CLIP dans le répertoire peptidique des molécules de classe II et son influence sur l'activité de HLA-DM (111). Les résultats de cette étude ont apporté des informations supplémentaires sur l'effet de l'affinité du CLIP avec la molécule de classe II du CMH sur la présentation des peptides. Ce groupe a démontré que l'échange peptidique pouvait se faire en absence de HLA-DM lorsque que le CLIP avait une faible affinité pour les résidus de la niche peptidique. Effectivement, lors de sa dégradation, li se désassocie plus rapidement si le CLIP n'est pas lié fortement. La niche peptidique étant vide, un nouveau peptide peut s'y lier sans l'aide de HLA-DM et être par la suite présenté à la surface cellulaire (112). De plus, la lignée de souris transgénique exprimant li humain produit par ce groupe n'a pas démontré de différences phénotypiques significatives avec une souris de type sauvage. La présentation antigénique ainsi que l'expression des molécules de classe II en surface semblait normal chez ces souris. Puisque notre stratégie est de créer une lignée de souris Iip33 et Iip35, ces résultats nous permettent de confirmer que l'expression de Iip33 chez la souris servira d'un bon témoin pour notre étude.

Cependant, il faut se questionner sur la validité de ce modèle. Le nombre de cellules B exprimant Iip33 ou Iip35 est très faible (**Figure 3.11 et 3.10 respectivement**). Nous nous attendions à une expression présente dans toutes les cellules exprimant CIITA. En effet, nous avons optimisé la production des souris transgéniques en s'assurant d'un niveau d'expression cellulaire maximal pour chacune des constructions (Iip33 et Iip35). Tout d'abord, nous avons modifié la séquence en amont du premier AUG de li afin d'améliorer l'efficacité de la traduction de Iip35 en optimisant la séquence Kozak en 5'. Bien qu'il soit difficile de comparer l'efficacité d'initiation de la traduction entre l'ADNc muté et celui de type sauvage, il est toutefois clair que l'optimisation de la séquence Kozak permet une forte expression de Iip35 (**Figure 3.3**). Il pourrait même être intéressant d'effectuer cette mutation dans l'ADNc sauvage encodant Iip33 et Iip35 et ainsi évaluer le changement dans le ratio des deux isoformes.

D'autre part, tout comme le groupe de Mathis, nous avons inséré les fragments d'ADNc Iip33 ou Iip35 au site *Clal* du vecteur pDOI-6. À l'aide de ce plasmide, ce groupe a

produit une lignée de souris transgénique exprimant Ii où le CLIP avait été changé par l'épitope dominant E^k du cytochrome C reconnu par les cellules T. La protéine mutée avait aussi une extension supplémentaire de 42 acides aminés au C-terminale. Selon les résultats obtenus lors de cette étude, le niveau d'expression du transgène était comparable au niveau d'expression de Ii endogène présent dans le thymus et dans les organes lymphoïdes périphériques. Le système immunitaire de ces souris reste cependant à caractériser plus en profondeur par ce groupe (113). Les résultats du groupe précédent nous permettaient de nous assurer un choix adéquat de plasmide pour l'expression optimale de Ii. Par la suite, nous nous sommes donc assurés par transfection cellulaire que l'expression de Ii de nos constructions était spécifique au CPA. Lorsque nous observons la **figure 3.4** nous pouvons remarquer une importante différence d'expression entre les plasmides transfectés en absence et en présence de CIITA. Cette spécificité devait assurer l'expression de Ii dans les cellules présentatrices d'antigènes exclusivement. Puisque nos constructions étaient optimales, nous nous attendions alors à une expression dans la totalité de ces cellules chez nos souris transgéniques.

Nous pouvons ensuite nous demander si les souris transgéniques produites seront représentatives pour des études ultérieures. C'est avec la collaboration de l'équipe de D^{re} N. Labrecque de l'Université de Montréal que les fragments pDOI-6p33 et pDOI-6p35 ont été injectés dans des oocytes murins (**Figure 3.7**). Nous avons donc obtenu cinq souris transgéniques Iip35 et trois Iip33 (**Figure 3.8 et 3.9**). Cependant, la présence de l'ADNc n'assure pas son expression et le faible pourcentage de cellules B positives obtenus nous oblige à nous questionner sur notre modèle (**Figure 3.10 et 3.11**). Il faudrait comparer ces résultats avec d'autres générations subséquentes ainsi nous pourrions déterminer si ce problème d'expression est relié au site d'insertion puisqu'il serait transmis aux générations suivantes. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le faible niveau d'expression des souris transgéniques. Tout d'abord, il peut s'être glissé une erreur lors du dosage de l'ADNc avant l'injection. La stratégie de clonage était la même pour les deux souris. Il s'agit du même plasmide et du même promoteur et l'expression est beaucoup plus faible chez les souris Iip33. Ce qui pourrait expliquer le résultat obtenu. De plus, avec l'insertion d'Iip35 dans les CPA des souris, nous pouvons

nous attendre à un changement du patron d'expression. C'est-à-dire que l'expression pourrait avoir lieu dans des cellules plus immatures que celles testées. Le marqueur utilisé était le CD45 cependant, il ne discrimine pas quelles cellules B (immatures ou matures) expriment Iip35. Il informe sur la population quasi-totale des lymphocytes B. Chez l'humain l'expression d'Iip35 se fait de façon plus tardive dans la maturation de ces cellules. D'autres marqueurs cellulaires pourraient être utilisés tel que le niveau d'IgM en surface. Nous pourrions donc avoir plus de précisions sur quelles populations de cellules B expriment Iip35.

Un modèle optimal serait que toutes les cellules présentatrices d'antigènes matures (CIITA positives) expriment Iip33 ou Iip35 humain. Nous pourrions, soit réinjecter des ADNc dans des oocytes ou croiser les souris possédant le meilleur taux d'expression ensembles. Dans le cas des souris transgéniques Iip33, il serait préférable de réinjecter l'ADNc pour obtenir un pourcentage de cellules positives semblables à ceux obtenus pour les souris Iip35. De plus, nos souris ont été faites avec des souris où Li murin est présent. Il pourrait y avoir une compétition pour le transactivateur entre Li endogène exprimé et celui produit par l'ADNc. En plus, sachant que le groupe de Rudensky, a établi une lignée de souris Iip33, nous pouvons affirmer qu'il est possible d'obtenir de bons modèles. Les souris Iip33h établies par ce groupe avaient un niveau d'expression du transgène comparable au Li d'une souris de type sauvage. Lors de leurs analyses, ils ont obtenus un niveau d'expression de molécules de classe II du CMH similaire aux souris de type sauvage. Ils n'ont pas détecté de différence dans la dégradation de Iih, ni dans la présentation antigénique. Cependant, leur étude ne précise pas le promoteur utilisé pour l'expression de Iip33h chez les souris et a été faite à partir de souris qui n'exprimaient pas Li murin. Éliminant ainsi, l'hypothèse de compétition entre l'expression du transgène et de l'endogène. Finalement, ils ont détecté aucun signe d'auto-immunité chez ces souris (112). Ce modèle reste donc un excellent outil de recherche.

Il n'existe cependant pas encore de bon modèle animal pour l'étude de Iip35. Cette lignée de souris transgéniques serait unique et permettrait d'éclaircir l'importance de Iip35 chez l'humain. Effectivement, plusieurs pathologies sont associées au dérèglement

de son niveau d'expression. Avec les souris Iip35 obtenues, il serait important de vérifier en premier lieu si la présence de Iip35 a une influence sur les populations cellulaires des organes lymphoïdes en quantifiant la proportion de cellules B, T et dendritiques dans la rate, le thymus, les ganglions et la moelle osseuse. De plus, il serait important de connaître le niveau d'expression en surface des molécules de CMH II via l'analyse des lymphocytes B afin de déterminer si Iip35 exerce un effet de rétention sur les CHM de classe II murins. Par ailleurs, il faudra également déterminer les effets des transgènes sur le niveau d'expression de Ii murin et s'interroger à savoir si les molécules de CHM de classe II s'associeront préférentiellement avec Ii murin ou Ii transgénique. Bref, il s'agit de déterminer de quelle façon la présentation antigénique de ces souris sera modifiée par la présence de Iip35.

Dans un même ordre d'idées, puisque la chaîne invariante est importante dans la maturation des cellules B (81), un marquage du niveau d'expression d'IgM en surface des lymphocytes B provenant de ganglions, de la rate et de la moelle des souris pourrait nous informer sur leur capacité à maturer en présence des transgènes p33 ou p35. Aussi, sachant que Ii a un impact important sur le répertoire des cellules T (26,77,79) un marquage du niveau d'expression de CD3, CD4 et CD8 des cellules du thymus, de la rate et des ganglions pourrait nous informer sur l'état de maturation, de différenciation et d'activation des lymphocytes T (77,79,82).

Par ailleurs, en plus de caractériser le système immunitaire de souris transgéniques obtenues, il serait intéressant d'optimiser le modèle en modifiant le fond génétique des souris. En effet, les oocytes utilisés proviennent de souris de souche FVB exprimant l'haplotype H-2^a (114). Cependant, puisque certains allèles sont plus propices au développement des maladies auto-immunes (83), l'expression de l'haplotype H-2^b serait plus favorable à l'étude de ces maladies. Pour cette raison, les souris transgéniques exprimant un niveau important des transgènes Iip33 ou Iip35 devront être croisées avec des souris C57BL/6 exprimant l'haplotype H-2^b (115,116). Les souris transgéniques obtenues expriment Ii murin ainsi que Ii humain p33 ou p35. Nous pourrions nous

attendre à une modification du répertoire peptidique présenté par les molécules de classe II du CMH et peut-être même au développement d'auto-immunité.

Une fois le fond génétique modifié, les souris pourront être croisées ultérieurement avec des souris *Ii*^{-/-} pour que la seule forme de *Ii* exprimée soit celle du transgène. Puisque les souris *Ii*^{-/-} démontrent une diminution de l'expression des CHM II en surface (77,79,82), l'ajout du transgène *Iip33* devrait restaurer cette expression. Cependant, l'expression de *Iip35* seul pourrait avoir une influence sur la maturation, le transport et l'expression de ces molécules et pourrait même avoir un effet de rétention dans le réticulum endoplasmique (70,73,77,117). De plus, en tenant compte du fait que le niveau d'expression de *Iip35* peut être un facteur influençant le développement du diabète juvénile (118), ce modèle d'étude pourrait être optimisé par le croisement avec des souris humanisées pour l'haplotype HLA-DQ8, plus susceptible au développement de cette maladie (119). Finalement, on pourrait même croiser les lignées *Iip33* et *Iip35* ensembles et faire varier les niveaux d'expression de chacune des isoformes. Ceci pourrait caractériser comment le dérèglement de l'expression de ces protéines influence le développement de certaines pathologies.

D'autre part, un modèle murin *Iip35* permettrait de découpler les fonctions de *Ii* dans la présentation antigénique versus ses fonctions de différents ligands ou de récepteurs. En effet, *Ii*, souvent appelé CD74, a été reconnu lors de certaines études pour sa capacité de se lier avec le CD44 des lymphocytes T. Lors de sa maturation certains *Ii* acquièrent un composé de chondroïtine sulfate. Cette forme *Ii*-CS présente en surface cellulaire permettrait la stimulation des cellules T (120). Cependant, *Iip35* ne migre pas vers la surface, une diminution de cette stimulation via CD44 pourrait donc être observée dans ce modèle. De plus, certaines cytokines sont capables de lier le CD74 (*Ii*) présent à la surface cellulaire. Le MIF (Macrophage migration inhibitory factor) est une cytokine reconnue pour être associée à l'induction du cancer intestinal impliquant *Helicobacter pylori*. La liaison de MIF avec le CD74 favoriserait le développement de ce cancer (121). Les modèles de souris transgéniques *Iip33* et *Iip35* pourront donc apporter de plus amples informations sur les rôles de *Ii* autres que la présentation antigénique.

Ainsi, après avoir caractérisé l'état du système immunitaire et optimisé le modèle murin, des tests de présentations antigéniques pourront être effectués. L'utilisation de ces souris comme modèle pour le diabète juvénile serait très utile pour comprendre le processus pathologique de cette maladie. On pourrait même par la suite, instaurer des traitements ou vaccins permettant de diminuer ou même d'éliminer les causes et symptômes de la maladie. Les possibilités d'études deviennent donc très vastes avec ce modèle de souris transgéniques.

4. 2 Production d'anticorps polyclonaux spécifiques à lip35.

La production d'anticorps est une technique très répandue et permet une forte spécificité lors d'études sur une protéine distincte. En plus, les anticorps commerciaux existants pour détecter la chaîne invariante ne sont pas spécifiques à une isoforme en particulier. Les plus connus sont PIN-1 et BU45. Ceux-ci reconnaissent respectivement les parties N-terminale et C-terminale de tous les isoformes. La production d'un anticorps anti-Iip35 devient donc très intéressante car il permettrait de discriminer soit en immunofluorescence ou bien en immunoprécipitation la fonction de Iip35 avec les autres isoformes présentes chez l'humain. Nous pourrions répondre à plusieurs interrogations telles quelle est la demi-vie de Iip35? Quelle forme a le complexe CMHII/Ii lorsque que Iip35 est présente? Quel est le cheminement cellulaire de ce complexe? Vers quels compartiments se dirige t'il et se dégrade t'il? Quel est le ciblage cellulaire spécifique de Iip35?

Au départ, nous aurions voulu produire un anticorps monoclonaux pour éviter les réactions croisées qui sont plus fréquentes avec l'utilisation d'anticorps polyclonaux. Cependant, nous avons échoué et ce même après trois reprises. Les hybridomes ne produisaient pas d'anticorps même si un niveau élevé sérique avait été détecté. Nous avons donc choisi les anticorps polyclonaux. Pour ce faire, nous avons utilisé deux lapins s'assurant ainsi une forte réponse immunitaire de la part d'au moins un des lapins. Il est connu que la réponse polyclonale diffère d'un animal à l'autre (85). Effectivement, la

réponse a été différente entre le lapin 1 et le lapin 2 (**Figure 3.13, 3.14 et 3.15**). Le lapin 1 ayant une production plus forte : la densité optique correspondant au taux d'anticorps sérique des lapins, obtenue par ELISA, était considérablement plus élevée pour le lapin 1.

D'autre part, la caractérisation du sérum s'est poursuivie par le marquage intracellulaire de cellules 293T*Iip35* exprimant de façon stable *Iip35*. Pour ce faire, les sérums du lapin 1 et 2 ont été utilisés comme anticorps primaire d'un marquage indirect. Le marquage s'est avéré négatif pour les deux sérums malgré le fait que les anticorps produits sont spécifiques pour la séquence peptidique des 16 acides aminés de la queue cytoplasmique de *Iip35*. Il se peut que cette partie de la chaîne invariante soit inaccessible dans les cellules pour permettre la liaison des anticorps. Le marquage a été refait à plusieurs reprises et avec plusieurs dilutions. Nous avons même repris le marquage après la purification des anticorps en obtenant toujours le même résultat. Nous aurions peut-être pu faire d'autres méthodes de fixation. Nous avons fait la fixation avec la paraformaldéhyde mais nous aurions pu utiliser le méthanol par exemple ou d'autres tels le Triton ou une solution de Tris-HCL. Cette modification aurait peut-être augmenté l'accessibilité de la protéine à l'anticorps produit.

Cependant, nos résultats ont montré que l'anticorps produit par le lapin 1 pouvait détecter la chaîne invariante *Iip35* en immunobuvardage (**Figure 3.17 et 3.18**). En fait, nous sommes déçus puisque cet anticorps aurait été extrêmement utile lors de détections en cytométrie en flux. De plus, la technique d'immunofluorescence est faite selon le même protocole que la détection avec le cytomètre, alors nous risquons de ne pas pouvoir utiliser cette technique avec cet anticorps. Cependant, si elle fonctionne, cette technique permettra de suivre seulement *Iip35* où *Iip33* ne serait pas détecté. On aurait aussi voulu un anticorps monoclonal, par contre, cet anticorps sera tout de même très utile pour la caractérisation des souris transgéniques *Iip35*.

4.4 Conclusion

La présentation antigénique par les molécules de CMH II nécessite la présence de la chaîne invariante. Celle-ci s'associe aux molécules de CMH II au niveau du réticulum endoplasmique et permet le bon repliement des molécules. Il sert aussi de chaperon et guide le complexe vers les compartiments endosomaux tout en permettant une maturation adéquate des molécules de CMH II. Par ailleurs, Iip35 joue un rôle important dans le système immunitaire humain. Le dérèglement de son expression semble avoir un impact sur le développement de certaines maladies tel que le diabète de type 1. Cependant, la caractérisation fonctionnelle de Iip35 n'est pas complète. Le développement d'outils d'étude est alors essentiel pour mieux comprendre son rôle dans la présentation antigénique et son influence dans l'apparition de maladies auto-immunes chez certains individus.

Nous avons donc établi une lignée de souris transgéniques exprimant Iip35 et Iip33 humain. Nous avons obtenu une proportion assez faible de lymphocytes B Iip35 positifs : le meilleur taux obtenu étant 38%. Pour le transgène Iip33, les résultats étaient beaucoup plus faibles car seulement 9% des cellules B étaient positives. Cependant, les cellules positives expriment un niveau cellulaire élevé du transgène. D'autres tests devront être effectués sur les souris et sur les générations suivantes pour déterminer si c'est le site d'insertion du transgène qui explique ce faible résultat. Les souris Iip33 servent de témoin pour les études qui seront effectuées avec les souris Iip35. Il sera nécessaire d'étudier la maturation, la différenciation et l'activation des lymphocytes T et B. De plus, il faudra caractériser l'expression des molécules de CMH II et la présentation antigénique. Enfin, ces souris devront être croisées avec des souris négatives pour Ii (Ii-/-) pour connaître l'influence du transgène sur le système immunitaire des souris. Nous pouvons par contre nous demander si notre modèle sera bon puisque les niveaux d'expressions sont très faibles, surtout pour les Iip33. Il serait même préférable de réinjecter ces souris pour obtenir un niveau comparable au Iip35. De plus, l'anticorps

obtenus n'est pas efficace dans toutes les techniques. Ce qui restreint beaucoup son utilisation.

La caractérisation de *Iip35* demande encore plusieurs études. Son rôle qui semble important pour la réponse du système immunitaire reste toujours obscur. Sachant que le dérèglement de son expression peut engendrer des pathologies, il est alors primordial d'optimiser le modèle de souris transgénique *Iip35*. Nous pourrions alors faire varier son taux d'expression et observé s'il y a développement d'auto-immunité. L'utilisation d'un modèle de souris transgénique permettra donc d'avancer les recherches et de mieux comprendre les maladies auto-immunes.

Bibliographie

1. Delves, P. J. and I. M. Roitt. 2000. The immune system : First of two parts. *The New England Journal of Medicine* 34:37-50.
2. Bryant, P. and H. Ploegh. 2004. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr.Opin.Immunol.* 16:96-102.
3. Jutras, I. and M. Desjardins. 2005. Phagocytosis: At the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 21:511-527.
4. Delves, P. J. and I. M. Roitt. 2000. The immune system, Second of two par. *The New England Journal of Medicine* 343:108-117.
5. Horton, R., L. Wilming, V. Rand, R. C. Lovering, E. A. Bruford, V. K. Khodiyar, M. J. Lush, S. Povey, C. C. Talbot, M. W. Wrigho, H. M. Wain, J. Trowsdale, A. Ziegler, and S. Beck. 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics* 5:889-899.
6. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
7. McDevitt H.O. 2000. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. *Annual Reviews of Immunology* 18:1-17.
8. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
9. Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.
10. Klein, J. and A. Sato. 1998. Birth of the malor hiscompatibility complexe. *Scand.J.Immunol.* 47:199-209.
11. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
12. Engelhard, V. H. 1994. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 12:181-207.
13. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
14. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.

15. Gut-Landmann, S. L., J. M. Waldburger, M. Krawczyk, L. A. Otten, T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea, and W. Reith. 2004. Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *European Journal of Immunology* 34:1513-1525.
16. Mosyak, L., D. M. Zaller, and D. C. Wiley. 1998. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 9:377-383.
17. Denzin, L. K., D. B. Sant'Angelo, C. Hammond, M. J. Surman, and P. Cresswell. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278:106-109.
18. Cresswell, P. 1994. Assembly, Transport, and Function of Mhc Class-II Molecules. *Annual Review of Immunology* 12:259-293.
19. Cresswell, P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505-507.
20. Jameson, S. C., K. A. Hogquist, and M. J. Bevan. 1995. Positive selection of thymocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 13:93-126.
21. Neefjes, J. J. 1996. Antigen presentation by MHC class I and II molecules. *Immunobiology* 195:456-460.
22. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
23. York, I. A. and K. L. Rock. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu.Rev.Immunol.* 14:369-396.
24. Dixon, A. M., J. S. Bradford, E. E. Matthews, J. P. Dawson, and Engelman D.M. 2006. Invariant Chain Transmembrane Domain Trimerization: A Step in MHC Class II Assembly. *Biochemistry* 45:5228-5234.
25. Dixon, A. M., J. S. Bradford, E. E. Matthews, J. P. Dawson, and Engelman D.M. 2006. Invariant Chain Transmembrane Domain Trimerization: A Step in MHC Class II Assembly. *Biochemistry* 45:5228-5234.
26. Elliott, E. A., J. R. Drake, S. Amigorena, J. Elsemore, P. Webster, I. Mellman, and R. A. Flavell. 1994. The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J.Exp.Med.* 179:681-694.
27. Odorizzi, C. G., I. S. Trowbridge, L. Xue, C. R. Hopkins, C. D. Davis, and J. F. Collawn. 1994. Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J.Cell Biol.* 126:317-330.

28. Roche, P. A. and P. Cresswell. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345:615-618.
29. Teyton, L., D. O'Sullivan, P. W. Dickson, V. Lotteau, A. Sette, P. Fink, and P. A. Peterson. 1990. Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 348:39-44.
30. Roche, P. A. and P. Cresswell. 1991. Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:3150-3154.
31. Riese, R. J., P. R. Wolf, D. Bromme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman. 1996. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4:357-366.
32. Nakagawa, T. Y. and A. Y. Rudensky. 1999. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol.Rev.* 172:121-129.
33. Matza, D., A. Kerem, and I. Shachar. 2003. Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol.* 24:264-268.
34. Stebbins, C. C., G. E. Loss, Jr., C. G. Elias, A. Chervonsky, and A. J. Sant. 1995. The requirement for DM in class II-restricted antigen presentation and SDS-stable dimer formation is allele and species dependent. *J.Exp.Med.* 181:223-234.
35. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
36. Machamer, C. E. and P. Cresswell. 1982. Biosynthesis and glycosylation of the invariant chain associated with HLA-DR antigens. *J.Immunol.* 129:2564-2569.
37. Neumann, J., N. Shach, and N. Koch. 2001. Glycosylation signals that separate the trimerization from the MHC Class II-binding domain control intracellular degradation of invariant chain. *Journal of Biological Chemistry* 276:13469-13475.
38. Kuwana, T., P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1998. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A.* 95:1056-1061.
39. O'Sullivan, D. M., D. Noonan, and V. Quaranta. 1987. Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternative splicing and alternate initiation of transcription/translation. *J.Exp.Med.* 166:444-450.

40. Strubin, M., C. Berte, and B. Mach. 1986. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* 5:3485-3488.
41. Kozak, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44:283-292.
42. Jasanoff, A., G. Wagner, and D. C. Wiley. 1998. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J.* 17:6812-6818.
43. Jasanoff, A., G. Wagner, and D. C. Wiley. 1998. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J.* 17:6812-6818.
44. Ashman, J. B. and J. Miller. 1999. A role for the transmembrane domain in the trimerization of the MHC class II-associated invariant chain. *J.Immunol.* 163:2704-2712.
45. Kukol, A., J. Torres, and I. T. Arkin. 2002. A structure for the trimeric MHC class II-associated invariant chain transmembrane domain. *Journal of Molecular Biology* 320:1109-1117.
46. Romagnoli, P. and R. N. Germain. 1994. The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J.Exp.Med.* 180:1107-1113.
47. Stumptner-Cuvelette, P. and P. Benaroch. 2002. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim.Biophys.Acta* 1542:1-13.
48. Anderson, K. S. and P. Cresswell. 1994. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J.* 13:675-682.
49. Bonnerot, C., M. S. Marks, P. Cosson, E. J. Robertson, E. K. Bikoff, R. N. Germain, and J. S. Bonifacio. 1994. Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO J.* 13:934-944.
50. Romagnoli, P., C. Layet, J. Yewdell, O. Bakke, and R. N. Germain. 1993. Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *J.Exp.Med.* 177:583-596.
51. Pond, L., L. A. Kuhn, L. Teyton, M.-P. Schutze, J. A. Tainer, M. R. Jackson, and P. A. Peterson. 1995. A role for the acidic residues in Di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J.Biol.Chem.* 270:19989-19997.

52. Dugast, M., H. Toussaint, C. Dousset, and P. Benaroch. 2005. AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *Journal of Biological Chemistry* 280:19656-19664.
53. Wang, K., P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1997. Decreased endosomal delivery of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes in dynamin-deficient cells. *J.Biol.Chem.* 272:17055-17060.
54. Anderson, M. S., K. Swier, L. Arneson, and J. Miller. 1993. Enhanced antigen presentation in the absence of the invariant chain endosomal localization signal. *J.Exp.Med.* 178:1959-1969.
55. Matza, D., A. Kerem, and I. Shachar. 2003. Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol.* 24:264-268.
56. Matza, D., A. Kerem, H. Medvedovsky, F. Lantner, and I. Shachar. 2002. Invariant chain-induced B cell differentiation requires intramembrane proteolytic release of the cytosolic domain. *Immunity.* 17:549-560.
57. Matza, D., A. Kerem, and I. Shachar. 2003. Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol.* 24:264-268.
58. Benlagha, K., S. H. Park, R. Guinamard, C. Forestier, L. Karlsson, C.-H. Chang, and A. Bendelac. 2004. Mechanism governing B cell developmental defects in invariant chain-deficient mice. *Journal of Immunology* 172:2076-2083.
59. Maehr, R., M. Kraus, and H. L. Ploegh. 2004. Mice deficient in invariant-chain and MHC class II exhibit a normal mature B2 cell compartment. *Eur.J.Immunol.* 34:2230-2236.
60. Marks, M. S., J. S. Blum, and P. Cresswell. 1990. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J.Cell Biol.* 111:839-855.
61. Lotteau, V., L. Teyton, A. Peleraux, T. Nilsson, L. Karlsson, S. L. Schmid, V. Quaranta, and P. A. Peterson. 1990. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348:600-605.
62. Schutze, M.-P., P. A. Peterson, and M. R. Jackson. 1994. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 13:1696-1705.
63. Lamb, C. A. and P. Cresswell. 1992. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J.Immunol.* 148:3478-3482.

64. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.
65. Margeta-Mitrovic, M., Y. N. Jan, and L. Y. Jan. 2000. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27:97-106.
66. Standley, S., K. W. Roche, J. McCallum, N. Sans, and R. J. Wenthold. 2000. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28:887-898.
67. O'Kelly, I., M. H. Butler, N. Zilberberg, and S. A. Goldstein. 2002. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111:577-588.
68. Nufer, O. and H.-P. Hauri. 2003. ER Export: Call 14-3-3. *Curr Biol* 13.
69. Anderson, H. A. and P. A. Roche. 1998. Phosphorylation regulates the delivery of MHC class II invariant chain complexes to antigen processing compartments. *J.Immunol.* 160:4850-4858.
70. Warmerdam, P. A., E. O. Long, and P. A. Roche. 1996. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J.Cell Biol.* 133:281-291.
71. Yan, G., L. Shi, A. Penfornis, and D. L. Faustman. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.
72. Yan, G., L. Shi, A. Penfornis, and D. L. Faustman. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.
73. Arunachalam, B., C. A. Lamb, and P. Cresswell. 1994. Transport properties of free and MHC class II associated oligomers containing different isoforms of human invariant chain. *Int.Immunol.* 6:439-451.
74. Veenstra, H., P. Jacobs, and E. B. Dowdle. 1993. Processing of HLA-class II invariant chain and expression of the p35 form is different in malignant and transformed cells. *Blood* 82:2494-2500.
75. Veenstra, H., P. Jacobs, and E. B. Dowdle. 1996. Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Immunol.* 171:68-73.
76. Yan, G., L. Shi, A. Penfornis, and D. L. Faustman. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.

77. Bikoff, E. K., L.-Y. Huang, V. Episkopou, J. van Meerwijk, R. N. Germain, and E. J. Robertson. 1993. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4⁺ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J.Exp.Med.* 177:1699-1712.
78. Nufer, O. and H.-P. Hauri. 2003. ER Export: Call 14-3-3. *Curr Biol* 13.
79. Viville, S., J. J. Neefjes, V. Lotteau, A. Dierich, M. Lemeur, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1993. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72:635-648.
80. Topilski, I., A. Harmelin, R. A. Flavell, Y. Levo, and I. Shachar. 2002. Preferential Th1 immune response in invariant chain-deficient mice. *J.Immunol.* 168:1610-1617.
81. Shachar, I. and R. A. Flavell. 1996. Requirement for invariant chain in B cell maturation and function. *Science* 274:106-108.
82. Shachar, I., E. A. Elliott, B. Chasnoff, I. S. Grewal, and R. A. Flavell. 1995. Reconstitution of invariant chain function in transgenic mice in vivo by individual p31 and p41 isoforms. *Immunity* 3:373-383.
83. Bikoff, E. K., R. N. Germain, and E. J. Robertson. 1995. Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity* 2:301.
84. Taneja, V. and C. S. David. 1998. HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity. *J.Clin.Invest* 101:921-926.
85. Lipman, N. S., L. R. Jackson, L. J. Trudel, and F. Weis-Garcia. 2005. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR journal* 46:258-268.
86. Hendriksen, C. F. 2005. Laboratory Animals and Immunization Procedures: Challenges and Opportunities. *ILAR journal* 46:227-229.
87. Hendriksen, C. F. and M. Leenaars. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR journal* 46:269-279.
88. Lipman, N. S., L. R. Jackson, L. J. Trudel, and F. Weis-Garcia. 2005. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR journal* 46:258-268.
89. Ghodke, Y., K. Joshi, A. Chopra, and B. Patwardhan. 2005. HLA and disease. *European Journal of Epidemiology* 20:475-488.

90. Chao, C. C., H. K. Sytwu, E. L. Chen, J. Toma, and H. O. McDevitt. 1999. The role of MHC class II molecules in susceptibility to type I diabetes: identification of peptide epitopes and characterization of the T cell repertoire. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96:9299-9304.
91. Jones, P. P. and L. Zhu. 1989. Complete sequence of the murine invariant chain (Ii) gene. *Nucleic Acids Res.* 17:447-448.
92. Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59.
93. Sekaly, R.-P., C. Tonnelles, M. Strubin, B. Mach, and E. O. Long. 1986. Cell surface expression of class II histocompatibility antigens occurs in the absence of the invariant chain. *J.Exp.Med.* 164:1490-1504.
94. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.
95. van Santen, H., C. Benoist, and D. Mathis. 2000. A cassette vector for high-level reporter expression driven by a hybrid invariant chain promoter in transgenic mice. *J.Immunol.Methods* 245:133-137.
96. Brunet, A., A. Samaan, F. Deshaies, T. J. Kindt, and J. Thibodeau. 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DO β . *J.Biol.Chem.* 275:37062-37071.
97. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.
98. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman, and K. Struhl. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates, New York, pp. 930-932.
99. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.
100. Kozak, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44:283-292.
101. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.

102. van Santen, H., C. Benoist, and D. Mathis. 2000. A cassette vector for high-level reporter expression driven by a hybrid invariant chain promoter in transgenic mice. *J.Immunol.Methods* 245:133-137.
103. Yan, G., L. Shi, A. Penfornis, and D. L. Faustman. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.
104. Veenstra, H., P. Jacobs, and E. B. Dowdle. 1993. Processing of HLA-class II invariant chain and expression of the p35 form is different in malignant and transformed cells. *Blood* 82:2494-2500.
105. Yan, G., L. Shi, A. Penfornis, and D. L. Faustman. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.
106. Taneja, V. and C. S. David. 1998. HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity. *J.Clin.Invest* 101:921-926.
107. Wen, L., F. S. Wong, J. Tang, N.-Y. Chen, M. Altieri, C. David, R. Flavell, and R. Sherwin. 2000. In Vivo Evidence for the Contribution of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-DQ Molecules to the Development of Diabetes. *J.Exp.Med* 191:97-104.
108. Wen, L., N.-Y. Chen, J. Tang, R. Sherwin, and Wong F.S. 2001. The regulatory role of DR4 in a spontaneous diabetes DQ8 transgenic model. *Journal of Clinical investigation* 107:871-880.
109. Castellino, F., G. M. Zhong, and R. N. Germain. 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules: Invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum.Immunol.* 54:159-169.
110. Strubin, M., E. O. Long, and B. Mach. 1986. Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiations at two in-phase AUGs. *Cell* 47:619-625.
111. Honey, K., K. Forbush, P. E. Jensen, and A. Y. Rudensky. 2004. Effect of decreasing the affinity of the class II-associated invariant chain peptide on the MHC class II peptide repertoire in the presence or absence of H-2M. *Journal of Immunology* 172:4142-4150.
112. Honey, K., K. Forbush, P. E. Jensen, and A. Y. Rudensky. 2004. Effect of Decreasing the Affinity of the Class II-Associated Invariant Chain Peptide on the MHC Class II Peptide Repertoire in the Presence or Absence of H-2M1. *J.Immunol.* 172:4142-4150.

113. van Santen, H., C. Benoist, and D. Mathis. 2000. A cassette vector for high-level reporter expression driven by a hybrid invariant chain promoter in transgenic mice. *J.Immunol.Methods* 245:133-137.
114. Azoulay, A., M. Brahic, and Bureau JF. 1994. FVB mice transgenic for the H-2Db gene become resistant to persistent infection by Theiler's virus. *J.Virol.* 68:4049-4052.
115. Azoulay, A., M. Brahic, and Bureau JF. 1994. FVB mice transgenic for the H-2Db gene become resistant to persistent infection by Theiler's virus. *J.Virol.* 68:4049-4052.
116. Chu, C.-Q., L. Mayton, B. Wu, and P. H. Wooley. 2003. IFN deficient C57BL/6 (H-2^b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor V β 6 and V β 8 in arthritic joints . *Annals of the Rheumatic Diseases* 62:983-990.
117. Veenstra, H., P. Jacobs, and E. B. Dowdle. 1996. Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Immunol.* 171:68-73.
118. Yan, G., L. Shi, A. Penforis, and D. L. Faustman. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.
119. Taneja, V. and C. S. David. 1999. HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunol.Rev.* 169:67-79.
120. Naujokas, M. F., M. Morin, M. S. Anderson, M. Peterson, and J. Miller. 1993. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* 74:257-268.
121. Beswick, E. J., I. V. Pinchuk, G. Suarez, G. C. Sierre, and V. E. Reyes. 2006. Helicobacter pylori CagA-Dependent Macrophage Migration Inhibitory Factor Produced by Gastric Epithelial Cells Binds to CD74 and Stimulates Procarcinogenic Events1. *J.Immunol.* 176:6794-6801.

Bibliographie

1. Delves, P. J. and I. M. Roitt. 2000. The immune system : First of two parts. *The New England Journal of Medicine* 34:37-50.
2. Bryant, P. and H. Ploegh. 2004. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr.Opin.Immunol.* 16:96-102.
3. Jutras, I. and M. Desjardins. 2005. Phagocytosis: At the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 21:511-527.

4. Delves, P. J. and I. M. Roitt. 2000. The immune system, Second of two par. *The New England Journal of Medicine* 343:108-117.
5. Horton, R., L. Wilming, V. Rand, R. C. Lovering, E. A. Bruford, V. K. Khodiyar, M. J. Lush, S. Povey, C. C. Talbot, M. W. Wrigho, H. M. Wain, J. Trowsdale, A. Ziegler, and S. Beck. 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics* 5:889-899.
6. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
7. McDevitt H.O. 2000. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. *Annual Reviews of Immunology* 18:1-17.
8. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
9. Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.
10. Klein, J. and A. Sato. 1998. Birth of the malor hiscompatibility complexe. *Scand.J.Immunol.* 47:199-209.
11. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
12. Engelhard, V. H. 1994. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 12:181-207.
13. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
14. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
15. Gut-Landmann, S. L., J. M. Waldburger, M. Krawczyk, L. A. Otten, T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea, and W. Reith. 2004. **Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes.** *European Journal of Immunology* 34:1513-1525.
16. Mosyak, L., D. M. Zaller, and D. C. Wiley. 1998. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 9:377-383.
17. Denzin, L. K., D. B. Sant'Angelo, C. Hammond, M. J. Surman, and P. Cresswell. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278:106-109.

18. Cresswell, P. 1994. Assembly, Transport, and Function of Mhc Class-II Molecules. *Annual Review of Immunology* 12:259-293.
19. Cresswell, P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505-507.
20. Jameson, S. C., K. A. Hogquist, and M. J. Bevan. 1995. Positive selection of thymocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 13:93-126.
21. Neefjes, J. J. 1996. Antigen presentation by MHC class I and II molecules. *Immunobiology* 195:456-460.
22. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
23. York, I. A. and K. L. Rock. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu.Rev.Immunol.* 14:369-396.
24. Dixon, A. M., J. S. Bradford, E. E. Matthews, J. P. Dawson, and Engelman D.M. 2006. Invariant Chain Transmembrane Domain Trimerization: A Step in MHC Class II Assembly. *Biochemistry* 45:5228-5234.
25. Dixon, A. M., J. S. Bradford, E. E. Matthews, J. P. Dawson, and Engelman D.M. 2006. Invariant Chain Transmembrane Domain Trimerization: A Step in MHC Class II Assembly. *Biochemistry* 45:5228-5234.
26. Elliott, E. A., J. R. Drake, S. Amigorena, J. Elsemore, P. Webster, I. Mellman, and R. A. Flavell. 1994. The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J.Exp.Med.* 179:681-694.
27. Odorizzi, C. G., I. S. Trowbridge, L. Xue, C. R. Hopkins, C. D. Davis, and J. F. Collawn. 1994. Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J.Cell Biol.* 126:317-330.
28. Roche, P. A. and P. Cresswell. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345:615-618.
29. Teyton, L., D. O'Sullivan, P. W. Dickson, V. Lotteau, A. Sette, P. Fink, and P. A. Peterson. 1990. Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 348:39-44.
30. Roche, P. A. and P. Cresswell. 1991. Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:3150-3154.

31. Riese, R. J., P. R. Wolf, D. Bromme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman. 1996. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4:357-366.
32. Nakagawa, T. Y. and A. Y. Rudensky. 1999. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol.Rev.* 172:121-129.
33. Matza, D., A. Kerem, and I. Shachar. 2003. Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol.* 24:264-268.
34. Stebbins, C. C., G. E. Loss, Jr., C. G. Elias, A. Chervonsky, and A. J. Sant. 1995. The requirement for DM in class II-restricted antigen presentation and SDS-stable dimer formation is allele and species dependent. *J.Exp.Med.* 181:223-234.
35. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
36. Machamer, C. E. and P. Cresswell. 1982. Biosynthesis and glycosylation of the invariant chain associated with HLA-DR antigens. *J.Immunol.* 129:2564-2569.
37. Neumann, J., N. Shach, and N. Koch. 2001. Glycosylation signals that separate the trimerization from the MHC Class II-binding domain control intracellular degradation of invariant chain. *Journal of Biological Chemistry* 276:13469-13475.
38. Kuwana, T., P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1998. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* 95:1056-1061.
39. O'Sullivan, D. M., D. Noonan, and V. Quaranta. 1987. Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternative splicing and alternate initiation of transcription/translation. *J.Exp.Med.* 166:444-450.
40. Strubin, M., C. Berte, and B. Mach. 1986. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* 5:3485-3488.
41. Kozak, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44:283-292.
42. Jasanoff, A., G. Wagner, and D. C. Wiley. 1998. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J.* 17:6812-6818.

43. Jasanoff, A., G. Wagner, and D. C. Wiley. 1998. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J.* 17:6812-6818.
44. Ashman, J. B. and J. Miller. 1999. A role for the transmembrane domain in the trimerization of the MHC class II-associated invariant chain. *J.Immunol.* 163:2704-2712.
45. Kukol, A., J. Torres, and I. T. Arkin. 2002. A structure for the trimeric MHC class II-associated invariant chain transmembrane domain. *Journal of Molecular Biology* 320:1109-1117.
46. Romagnoli, P. and R. N. Germain. 1994. The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J.Exp.Med.* 180:1107-1113.
47. Stumptner-Cuvelette, P. and P. Benaroch. 2002. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim.Biophys.Acta* 1542:1-13.
48. Anderson, K. S. and P. Cresswell. 1994. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J.* 13:675-682.
49. Bonnerot, C., M. S. Marks, P. Cosson, E. J. Robertson, E. K. Bikoff, R. N. Germain, and J. S. Bonifacio. 1994. Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO J.* 13:934-944.
50. Romagnoli, P., C. Layet, J. Yewdell, O. Bakke, and R. N. Germain. 1993. Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *J.Exp.Med.* 177:583-596.
51. Pond, L., L. A. Kuhn, L. Teyton, M.-P. Schutze, J. A. Tainer, M. R. Jackson, and P. A. Peterson. 1995. A role for the acidic residues in Di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J.Biol.Chem.* 270:19989-19997.
52. Dugast, M., H. Toussaint, C. Dousset, and P. Benaroch. 2005. AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *Journal of Biological Chemistry* 280:19656-19664.
53. Wang, K., P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1997. Decreased endosomal delivery of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes in dynamin-deficient cells. *J.Biol.Chem.* 272:17055-17060.
54. Anderson, M. S., K. Swier, L. Arneson, and J. Miller. 1993. Enhanced antigen presentation in the absence of the invariant chain endosomal localization signal. *J.Exp.Med.* 178:1959-1969.

55. Matza, D., A. Kerem, and I. Shachar. 2003. Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol.* 24:264-268.
56. Matza, D., A. Kerem, H. Medvedovsky, F. Lantner, and I. Shachar. 2002. Invariant chain-induced B cell differentiation requires intramembrane proteolytic release of the cytosolic domain. *Immunity.* 17:549-560.
57. Matza, D., A. Kerem, and I. Shachar. 2003. Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol.* 24:264-268.
58. Benlagha, K., S. H. Park, R. Guinamard, C. Forestier, L. Karlsson, C.-H. Chang, and A. Bendelac. 2004. Mechanism governing B cell developmental defects in invariant chain-deficient mice. *Journal of Immunology* 172:2076-2083.
59. Maehr, R., M. Kraus, and H. L. Ploegh. 2004. Mice deficient in invariant-chain and MHC class II exhibit a normal mature B2 cell compartment. *Eur.J.Immunol.* 34:2230-2236.
60. Marks, M. S., J. S. Blum, and P. Cresswell. 1990. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J.Cell Biol.* 111:839-855.
61. Lotteau, V., L. Teyton, A. Peleraux, T. Nilsson, L. Karlsson, S. L. Schmid, V. Quaranta, and P. A. Peterson. 1990. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348:600-605.
62. Schutze, M.-P., P. A. Peterson, and M. R. Jackson. 1994. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 13:1696-1705.
63. Lamb, C. A. and P. Cresswell. 1992. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J.Immunol.* 148:3478-3482.
64. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.
65. Margeta-Mitrovic, M., Y. N. Jan, and L. Y. Jan. 2000. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27:97-106.
66. Standley, S., K. W. Roche, J. McCallum, N. Sans, and R. J. Wenthold. 2000. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28:887-898.
67. O'Kelly, I., M. H. Butler, N. Zilberberg, and S. A. Goldstein. 2002. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111:577-588.

68. Nufer, O. and H.-P. Hauri. 2003. ER Export: Call 14-3-3. *Curr Biol* 13.
69. Anderson, H. A. and P. A. Roche. 1998. Phosphorylation regulates the delivery of MHC class II invariant chain complexes to antigen processing compartments. *J.Immunol.* 160:4850-4858.
70. Warmerdam, P. A., E. O. Long, and P. A. Roche. 1996. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J.Cell Biol.* 133:281-291.
71. Yan, G., L. Shi, A. Penfornis, and D. L. Faustman. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.
72. Yan, G., L. Shi, A. Penfornis, and D. L. Faustman. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.
73. Arunachalam, B., C. A. Lamb, and P. Cresswell. 1994. Transport properties of free and MHC class II associated oligomers containing different isoforms of human invariant chain. *Int.Immunol.* 6:439-451.
74. Veenstra, H., P. Jacobs, and E. B. Dowdle. 1993. Processing of HLA-class II invariant chain and expression of the p35 form is different in malignant and transformed cells. *Blood* 82:2494-2500.
75. Veenstra, H., P. Jacobs, and E. B. Dowdle. 1996. Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Immunol.* 171:68-73.
76. Yan, G., L. Shi, A. Penfornis, and D. L. Faustman. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.
77. Bikoff, E. K., L.-Y. Huang, V. Episkopou, J. van Meerwijk, R. N. Germain, and E. J. Robertson. 1993. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J.Exp.Med.* 177:1699-1712.
78. Nufer, O. and H.-P. Hauri. 2003. ER Export: Call 14-3-3. *Curr Biol* 13.
79. Viville, S., J. J. Neefjes, V. Lotteau, A. Dierich, M. Lemeur, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1993. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72:635-648.
80. Topilski, I., A. Harmelin, R. A. Flavell, Y. Levo, and I. Shachar. 2002. Preferential Th1 immune response in invariant chain-deficient mice. *J.Immunol.* 168:1610-1617.

81. Shachar, I. and R. A. Flavell. 1996. Requirement for invariant chain in B cell maturation and function. *Science* 274:106-108.
82. Shachar, I., E. A. Elliott, B. Chasnoff, I. S. Grewal, and R. A. Flavell. 1995. Reconstitution of invariant chain function in transgenic mice in vivo by individual p31 and p41 isoforms. *Immunity* 3:373-383.
83. Bikoff, E. K., R. N. Germain, and E. J. Robertson. 1995. Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity* 2:301.
84. Taneja, V. and C. S. David. 1998. HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity. *J.Clin.Invest* 101:921-926.
85. Lipman, N. S., L. R. Jackson, L. J. Trudel, and F. Weis-Garcia. 2005. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR journal* 46:258-268.
86. Hendriksen, C. F. 2005. Laboratory Animals and Immunization Procedures: Challenges and Opportunities. *ILAR journal* 46:227-229.
87. Hendriksen, C. F. and M. Leenaars. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR journal* 46:269-279.
88. Lipman, N. S., L. R. Jackson, L. J. Trudel, and F. Weis-Garcia. 2005. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR journal* 46:258-268.
89. Ghodke, Y., K. Joshi, A. Chopra, and B. Patwardhan. 2005. HLA and disease. *European Journal of Epidemiology* 20:475-488.
90. Chao, C. C., H. K. Sytwu, E. L. Chen, J. Toma, and H. O. McDevitt. 1999. The role of MHC class II molecules in susceptibility to type I diabetes: identification of peptide epitopes and characterization of the T cell repertoire. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96:9299-9304.
91. Jones, P. P. and L. Zhu. 1989. Complete sequence of the murine invariant chain (Ii) gene. *Nucleic Acids Res.* 17:447-448.
92. Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59.
93. Sekaly, R.-P., C. Tonnelle, M. Strubin, B. Mach, and E. O. Long. 1986. Cell surface expression of class II histocompatibility antigens occurs in the absence of the invariant chain. *J.Exp.Med.* 164:1490-1504.

94. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.
95. van Santen, H., C. Benoist, and D. Mathis. 2000. A cassette vector for high-level reporter expression driven by a hybrid invariant chain promoter in transgenic mice. *J.Immunol.Methods* 245:133-137.
96. Brunet, A., A. Samaan, F. Deshaies, T. J. Kindt, and J. Thibodeau. 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DO β . *J.Biol.Chem.* 275:37062-37071.
97. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.
98. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman, and K. Struhl. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates, New York, pp. 930-932.
99. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.
100. Kozak, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44:283-292.
101. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.
102. van Santen, H., C. Benoist, and D. Mathis. 2000. A cassette vector for high-level reporter expression driven by a hybrid invariant chain promoter in transgenic mice. *J.Immunol.Methods* 245:133-137.
103. Yan, G., L. Shi, A. Penforis, and D. L. Faustman. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.
104. Veenstra, H., P. Jacobs, and E. B. Dowdle. 1993. Processing of HLA-class II invariant chain and expression of the p35 form is different in malignant and transformed cells. *Blood* 82:2494-2500.
105. Yan, G., L. Shi, A. Penforis, and D. L. Faustman. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.

106. Taneja, V. and C. S. David. 1998. HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity. *J.Clin.Invest* 101:921-926.
107. Wen, L., F. S. Wong, J. Tang, N.-Y. Chen, M. Altieri, C. David, R. Flavell, and R. Sherwin. 2000. In Vivo Evidence for the Contribution of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-DQ Molecules to the Development of Diabetes. *J.Exp.Med* 191:97-104.
108. Wen, L., N.-Y. Chen, J. Tang, R. Sherwin, and Wong F.S. 2001. The regulatory role of DR4 in a spontaneous diabetes DQ8 transgenic model. *Journal of Clinical investigation* 107:871-880.
109. Castellino, F., G. M. Zhong, and R. N. Germain. 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules: Invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum.Immunol.* 54:159-169.
110. Strubin, M., E. O. Long, and B. Mach. 1986. Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiations at two in-phase AUGs. *Cell* 47:619-625.
111. Honey, K., K. Forbush, P. E. Jensen, and A. Y. Rudensky. 2004. Effect of decreasing the affinity of the class II-associated invariant chain peptide on the MHC class II peptide repertoire in the presence or absence of H-2M. *Journal of Immunology* 172:4142-4150.
112. Honey, K., K. Forbush, P. E. Jensen, and A. Y. Rudensky. 2004. Effect of Decreasing the Affinity of the Class II-Associated Invariant Chain Peptide on the MHC Class II Peptide Repertoire in the Presence or Absence of H-2M1. *J.Immunol.* 172:4142-4150.
113. van Santen, H., C. Benoist, and D. Mathis. 2000. A cassette vector for high-level reporter expression driven by a hybrid invariant chain promoter in transgenic mice. *J.Immunol.Methods* 245:133-137.
114. Azoulay, A., M. Brahic, and Bureau JF. 1994. FVB mice transgenic for the H-2Db gene become resistant to persistent infection by Theiler's virus. *J.Virol.* 68:4049-4052.
115. Azoulay, A., M. Brahic, and Bureau JF. 1994. FVB mice transgenic for the H-2Db gene become resistant to persistent infection by Theiler's virus. *J.Virol.* 68:4049-4052.
116. Chu, C.-Q., L. Mayton, B. Wu, and P. H. Wooley. 2003. IFN deficient C57BL/6 (H-2^b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor VB6 and VB8 in arthritic joints. *Annals of the Rheumatic Diseases* 62:983-990.

117. Veenstra, H., P. Jacobs, and E. B. Dowdle. 1996. Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Immunol.* 171:68-73.
118. Yan, G., L. Shi, A. Penforis, and D. L. Faustman. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.
119. Taneja, V. and C. S. David. 1999. HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunol.Rev.* 169:67-79.
120. Naujokas, M. F., M. Morin, M. S. Anderson, M. Peterson, and J. Miller. 1993. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* 74:257-268.
121. Beswick, E. J., I. V. Pinchuk, G. Suarez, G. C. Sierre, and V. E. Reyes. 2006. Helicobacter pylori CagA-Dependent Macrophage Migration Inhibitory Factor Produced by Gastric Epithelial Cells Binds to CD74 and Stimulates Procarcinogenic Events1. *J.Immunol.* 176:6794-6801.
122. Taneja, V. and C. S. David. 1999. HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunol.Rev.* 169:67-79.
123. Naujokas, M. F., M. Morin, M. S. Anderson, M. Peterson, and J. Miller. 1993. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* 74:257-268.
124. Beswick, E. J., I. V. Pinchuk, G. Suarez, G. C. Sierre, and V. E. Reyes. 2006. Helicobacter pylori CagA-Dependent Macrophage Migration Inhibitory Factor Produced by Gastric Epithelial Cells Binds to CD74 and Stimulates Procarcinogenic Events1. *J.Immunol.* 176:6794-6801.
125. Khalil Hayssam, 2004, Régulation de la présentation antigénique par la chaîne invariante Iip35 et la molécule non-classique HLA-DO. Thèse de l'Université de Montréal, Montréal, Canada,
126. Kanaseki T, Blanchard N, Hammer GE, Gonzalez F, Shastri N. ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity.* 2006 Nov;25(5):795-806

127. Les molécules de la reconnaissance immunitaire. 1994. In ADN recombinant, ed. De Boeck-Wesmael, pp. 293-312. Bruxelles
128. Ting JP, Trowsdale J., 2002 Genetic control of MHC class II expression, *Cell* 109 Supp:S21-S33.